

Das 20S Proteasom in Astrozyten und seine Rolle bei Entzündungsprozessen im Zentralnervensystem

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Diplom-Biologin Dagmar Siele
geboren am 02.02.1979 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
2. Prof. Dr. Bernhard Grimm
3. Prof. Dr. Orhan Aktas

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2009

Schau um dich, schau höher und ein Weg wird sich finden

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Das Proteasom-System	9
1.1.1 Das Proteasom im Zentralnervensystem	11
1.2 Astrozyten	12
1.2.1 Funktionen von Astrozyten	13
1.2.2 Astrozyten und der Schutz vor Infektionen.....	13
1.2.3 Das Proteasom in Astrozyten	14
1.3 Multiple Sklerose und ihr Erkrankungsmodell EAE	15
1.3.1 Multiple Sklerose	15
1.3.2 Das murine Erkrankungsmodell der MS: Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	16
1.4 CD8+ T-Zellen in inflammatorischen Erkrankungen: pathogene und regulierende Funktion	18
1.5 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte:	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien.....	21
2.1.4 Kits	23
2.1.5 Zellkulturmedien	23
2.1.6 Chromatographie-Materialien und Fertigsäulen	23
2.1.7 Antikörper	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Proteinbiochemische Methoden	24

2.2.1.1	Gewinnung von Zell- und Gewebe-Extrakten	24
2.2.1.1.1	Herstellung von Zell-Lysaten.....	24
2.2.1.1.2	Herstellung der Organhomogenate für die Immunpräzipitation von 20S Proteasomen	24
2.2.1.1.3	Herstellung der Organhomogenate bzw. der TSA-3 Zell-Lysate für die Präparation von 20S Proteasomen.....	24
2.2.1.2	Proteasomen Präparation.....	25
2.2.1.2.1	Präparation von 20S Proteasom aus Organhomogenaten und Zell-Lysat	25
2.2.1.2.2	Isolation von 20S Proteasomen aus primären Astrozyten.....	25
2.2.1.2.3	Auftrennung von 20S Proteasom-Subtypen.....	25
2.2.1.3	Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten	26
2.2.1.4	Proteinpräzipitation mittels TCA	26
2.2.1.5	Ethanol-Fällung von Proteinen für die 2D-PAGE	26
2.2.1.6	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)...	26
2.2.1.7	Westernblot Analyse und Immunodetektion.....	27
2.2.1.7.1	ECL Detektion.....	27
2.2.1.8	Coomassie-Färbung von Proteinen in Acrylamidgelen	28
2.2.1.9	Immunpräzipitation von Proteinen.....	28
2.2.1.10	Proteolytische Prozessierung von Modellpeptiden	28
2.2.1.11	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)	29
2.2.1.12	Proteinidentifizierung	29
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.2.1	RNA-Isolation aus Hirngewebe	29
2.2.2.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA	29
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (nach Sambrook et al. (1989)).....	29
2.2.2.4	RealTime-PCR	29
2.2.2.5	Affimetrix-Array-Hybridisierung.....	31
2.2.3	Zellkulturmethoden und EAE-Experimente.....	31
2.2.3.1	Kultur von adhärent wachsenden Zellen.....	31
2.2.3.2	Zellernte	32
2.2.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	32
2.2.3.4	Kultivierung von primären Astrozyten	32

2.2.3.5	EAE Experimente.....	32
2.2.4	Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	33
2.2.5	Verwendete Software	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Das 20S Proteasom in primären Astrozyten-Kulturen	36
3.2	Das 20S Proteasom in der Astrozyten-Zelllinie TSA-3	38
3.3	Das 20S Proteasom im Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen	41
3.4	Maus EAE Experimente.....	44
3.4.1	Untersuchungen zur transkriptionellen Expression (mRNA) von Immun proteasom-Untereinheiten im Großhirn von Mäusen nach Induktion einer EAE....	45
3.4.2	Immunhistologischer Nachweis von Immunproteasomen in Gehirnen EAE erkrankter Mäuse	49
3.4.3	20S Proteasom im Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen - Vergleich ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung	56
3.4.4	20S Proteasom im Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen - Vergleich ihrer Aktivitäten	59
3.4.5	Veränderung der Oberflächenladung von Proteasomen mit veränderter Aktivität...	61
3.5	Epitop-Generierung der Proteasomen isoliert aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion einer EAE	63
4	Diskussion	78
4.1	Das 20S Proteasom in primären Astrozyten-Kulturen und in der Astrozyten-Zelllinie TSA-3	79
4.2	Das 20S Proteasom im Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen	81
4.3	EAE-Experimente.....	83
4.3.1	Transkriptionelle Expression von Immunproteasom-Untereinheiten und immunhistologischer Nachweis von Immunproteasomen in Gehirnen EAE erkrankter Mäuse.....	83
4.3.2	20S Proteasom im Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen	86
4.3.3	Epitop-Generierung der Proteasomen aus dem Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen	88

Literaturverzeichnis.....	98
Abkürzungsverzeichnis.....	116
Anhänge.....	117
Danksagung.....	135
ERKLÄRUNG	136

Zusammenfassung

Das Proteasom ist das zentrale proteolytische System in eukaryontischen Zellen, welches die Mehrzahl der intrazellulären Proteine abbaut. Da viele essentielle Prozesse in der Zelle proteolytisch reguliert werden, besitzt das Proteasom eine außerordentliche biologische Bedeutung. Die Erforschung des Proteasoms im Zentralnervensystem (ZNS) steht erst am Anfang, dennoch zeigen zahlreiche Untersuchungen, dass Inhibition des Proteasoms bzw. die Beeinflussung des Ubiquitin-Proteasom-Systems mit vielen neurologischen oder neurodegenerativen Erkrankungen einhergeht.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit nach Veränderungen des Proteasoms in Entzündungsprozessen im Zentralnervensystem am Beispiel der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) in der Maus gesucht. Die EAE ist eine Modellerkrankung zur Untersuchung der Multiplen Sklerose (MS) beim Menschen. Im Fall der MS könnte das Proteasom Autoantigene prozessieren, deren Epitope zur Autoimmunreaktion gegen das Myelin der Nervenfasern führen. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen war das Proteasom in Astrozyten, das in dieser Arbeit erstmals analysiert wurde. Die Astrozyten stellen die größte Gruppe unter den Gliazellen dar und besitzen vielfältige Funktionen im ZNS. Dazu zählen neben den klassischen *housekeeping* Funktionen auch Aufgaben bei der Immunantwort. Sie sind eine Hauptquelle der Chemokinproduktion im Gehirn, sezernieren pro- und anti-inflammatorische Zytokine und beeinflussen über verschiedene Faktoren Neurone, Mikroglia und Makrophagen in ihrer Umgebung [1]. Der enge und für Neurone essentielle Kontakt prädestiniert Astrozyten, neuronale Erkrankungen mit auszulösen und zu modulieren.

In dieser Arbeit wurden in primär isolierten Astrozyten die Immununtereinheiten des Proteasoms detektiert. Durch Experimente mit der Astrozytenzelllinie TSA-3 konnte aber gezeigt werden, dass Astrozyten im unstimulierten Zustand nur Standardproteasom besitzen, auf Stimulation, z.B. mit γ -Interferon, jedoch mit der Bildung von Immunproteasomen reagieren können. Das Fehlen von Immunproteasom in Astrozyten unter *in vivo* Bedingungen deckte sich mit den Strukturanalysen von Proteasomen aus dem Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen, den mRNA-Expressionsanalysen sowie immunhistologischen Untersuchungen von Hirngewebe aus EAE Mäusen. Die aus dem Großhirn isolierten Proteasomen nach Induktion einer EAE durch Injektion von Myelin-Oligodendrocyten-

Glycoprotein (MOG) enthielten keine Immun-Untereinheiten. Es wurden zu jedem Zeitpunkt nur Standardproteasomen gefunden. Dennoch erfolgt eine Aktivitätsveränderung im Proteasom vor dem Auftreten der ersten EAE Symptome, die *in vitro* zu einem verlangsamten Substratabbau, aber zu einer effizienteren Epitopgenerierung aus einem MOG-Peptid führt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde unterstreichen die allgemeine Ansicht, dass das ZNS ein immun-privilegiertes Organ ist, denn selbst in den Bereichen des ZNS, in denen - durch die EAE ausgelöst - morphologische Läsionen immunhistologisch zu erkennen waren, wurde nur eine sehr moderate und streng begrenzte Veränderung des Proteasoms, einer zentralen Komponente bei der Immunantwort, nachgewiesen. Nur sehr wenige Zellen enthielten die Immunproteasom-Untereinheit $\beta 5i$. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Bildung von Immunproteasom in Gehirnzellen zur Induktion bzw. dem Aufrechterhalten einer EAE nicht notwendig ist.

1 Einleitung

1.1 Das Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) stellt den wichtigsten regulierten proteolytischen Degradationsmechanismus in eukaryontischen Zellen dar und ist deshalb an vielen essentiellen Vorgängen wie Zellteilung und –differenzierung, Apoptose, Signaltransduktion, der metabolischen Kontrolle sowie der Immun- und Stressantwort in der Zelle beteiligt [2, 3, 4, 5]. Das 26S/30S-Proteasom ist die zentrale proteinabbauende Multi-katalytische Protease des UPS [6]. Es besteht aus dem proteolytisch aktiven 20S-Kernkomplex und ein oder zwei peripheren regulatorischen 19S Partikeln, die für die Substraterkennung und -Bindung verantwortlich sind (Abb. 1A). Das 20S-Proteasom setzt sich aus vier aufeinander gestapelten heptameren Ringen zusammen (α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7), welche ihm eine zylindrische Form verleihen (Abb. 1B).

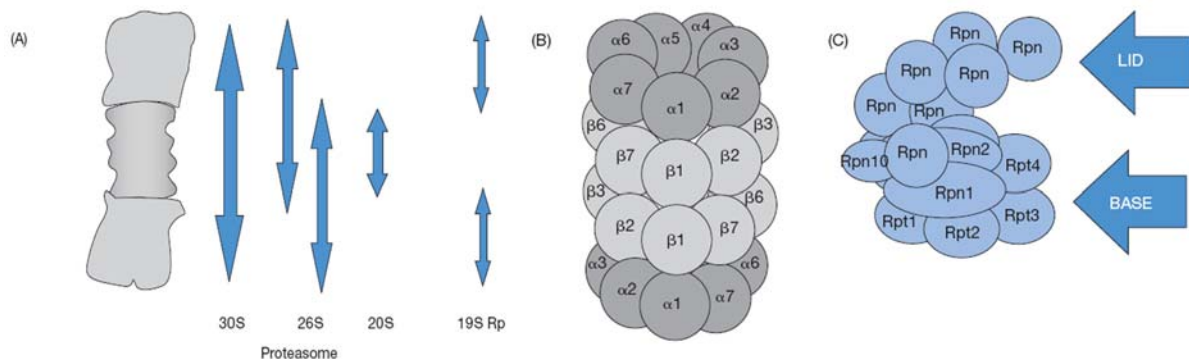


Abb. 1: Das Proteasom (A) Schematische Darstellung der Zusammensetzung des 26S und 30S Proteasoms aus 20S Proteasom und 19S Regulator(en). (B) Dargestellung der Untereinheiten-Zusammensetzung des 20S Proteasoms aus α - und β -Untereinheiten. (C) Aufbau des 19S Regulator-Komplexes bestehend aus Base (Rpt1-6, Rpn1, Rpn2) und Lid (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12) verbunden über Rpn10 (entnommen Dahlmann 2005 [6] und verändert)

Die äußeren Ringe bestehen aus sieben verschiedenen α -Untereinheiten und die inneren aus sieben unterschiedlichen β -Untereinheiten, von denen drei pro Ring die proteolytischen Aktivitäten tragen. Die N-terminalen Threoninreste der β -Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 bilden drei distinkte aktive Zentren, die auf der Innenseite des Komplexes liegen. Sie haben unterschiedliche Substratbindungstaschen, die die Präferenzen für die Hydrolyse hinter sauren, basischen und hydrophoben Aminosäureresten bestimmen. Dadurch ergeben sich die drei unterschiedlichen Aktivitäten des Proteasoms: Peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolase

(PGPH) Aktivität, trypsin-ähnliche Aktivität und chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Tab. 1). Diese Zuordnung von Spaltpräferenzen gelang mit Hilfe von fluorigenen Peptidsubstraten [7, 8, 9] . Hingegen ist die Spaltspezifität bei Proteinen und längeren Peptiden weniger ausgeprägt [10, 11] .

Tab. 1: Katalytische Aktivitäten der einzelnen β -Untereinheiten. PGPH: Peptidyl-Glutamyl-Peptid Hydrolase, ChT: Chymotrypsin-ähnlich, Try: Trypsin-ähnlich; Mit „i“ gekennzeichnete Untereinheiten sind Bestandteile des Immunproteasoms.

Untereinheit	Katalytische Aktivität	Hydrolyse nach	Verwendetes Peptidsubstrat
$\beta 1$ (δ)	PGPH	sauren AS	Z-L-L-E-AMC
$\beta 1i$ (LMP2)	ChT	hydrophoben AS	Suc-L-L-V-Y-AMC
$\beta 2$ (Z)	Try	basischen AS	Bz-V-G-R-AMC
$\beta 2i$ (MECL-1)	Try	basischen AS	Bz-V-G-R-AMC
$\beta 5$ (MB1)	ChT	hydrophoben AS	Suc-L-L-V-Y-AMC
$\beta 5i$ (LMP7)	ChT	hydrophoben AS	Suc-L-L-V-Y-AMC

Einen Großteil der Substrate für das UPS stellen nicht mehr benötigte oder neu synthetisierte, aber fehlgefaltete cytosolische, nukleäre und membranständige Proteine dar, die in der Regel mit Ubiquitin markiert werden. Die zum Abbau markierten Proteine werden durch das Proteasomen-System in Peptide mit einer Länge von 3-25 Aminosäuren gespalten, wobei die meisten Fragmente eine Länge von 7-8 Aminosäuren aufweisen. Einige der generierten Peptide dienen als Liganden für den „Major Histocompatibility Complex“ der Klasse I^c (MHC-Klasse-I) und werden an der Zelloberfläche den CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) präsentiert, wodurch es zu einer Identifizierung und gegebenenfalls Zerstörung karzinogener bzw. infizierter Zellen kommt. Aufgrund dieses Umstandes kommt dem Proteasom auch eine entscheidende Bedeutung bei der Immunüberwachung zu [5] .

In Mammalia-Zellen können im Rahmen der Immunantwort anstelle der proteolytisch aktiven Standarduntereinheiten $\beta 1$ (δ), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) die durch Zytokineinfluss (z.B. $\text{INF}\gamma$) induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2; *low molecular weight protein 2*), $\beta 2i$ (MECL-1; *multicatalytic endopeptidase complex-like 1*) und $\beta 5i$ (LMP7; *low molecular weight protein 7*) bei der *de novo* Biosynthese ins Proteasom eingebaut werden (Abb. 2) [12] .

Das so neu gebildete Immunproteasom besitzt eine veränderte Spaltpräferenz und scheint den Erfordernissen einer effizienteren Immunantwort besser angepasst zu sein als das Standardproteasom, jedoch gilt dies nicht für die Prozessierung aller Epitope [13]. Diese und andere Veränderungen modifizieren das Proteasom-System, um eine maximale Qualität und Quantität an Peptiden zu erhalten, die potentielle MHC-Epitope sind.

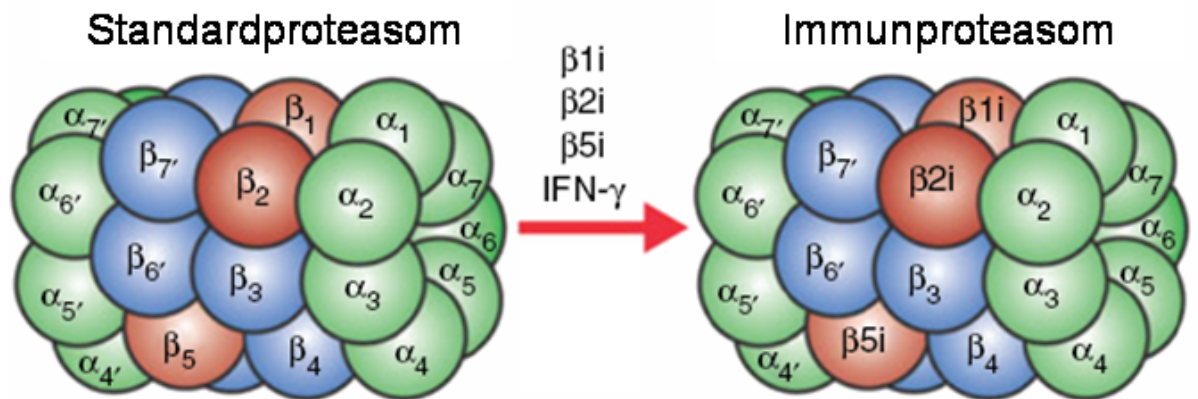


Abb. 2: Bildung des Immunproteasoms. Unter $\text{IFN}\gamma$ Einfluss werden alternative Proteasom-Untereinheiten expremiert und während der de novo Assemblierung anstelle der aktiven Untereinheiten des Standardproteasoms eingebaut. So werden die Untereinheiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) durch die induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) und $\beta 5i$ (LMP7) ersetzt. (entnommen Strehl 2005 und verändert)

1.1.1 Das Proteasom im Zentralnervensystem

Während das Proteasom-System in vielen Gewebe- und Zelltypen gut untersucht ist, so sind die Kenntnisse über das Proteasom im Zentralnervensystem (ZNS) noch sehr gering. In einem strukturell und funktionell einzigartigen Gewebe wie dem ZNS übernimmt das UPS spezielle Funktionen und ist an den Vorgängen des Axonwachstum /-guidings, der Synapsenbildung, sowie dem Erhalt der synaptischen Verbindung wesentlich beteiligt [14]. Aufgrund der essentiellen und zentralen Rolle des UPS für die Zelle überrascht es nicht, dass bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington, Störungen im UPS vorliegen, die entweder Ursache oder Wirkung der Erkrankung sein können [15, 16, 17].

Nach bisherigen Untersuchungen handelt es sich bei dem im Großhirn vorkommenden 20S Proteasom eher um den konstitutiven Standardtyp mit den katalytisch aktiven Untereinheiten $\beta 1$ (delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) [18, 19, 20]. Akaishi et al. [18] isolierten Proteasomen aus Rattenhirn und fanden fast das gleiche Untereinheiten-Muster und ähnliche Aktivitäten wie bei Proteasomen aus Skelettmuskel [19]. Piccinini et al. [21] konnten im Proteasom aus

Human-Hirn allerdings auch Immununtereinheiten nachweisen, jedoch überwog auch hier der Standardtyp. Mishto et al. detektierten im Westernblot die Untereinheit $\beta 1i$ (LMP2) und $\beta 5i$ (LMP7) in humanen Hippocampus-Extrakten und im Cerebellum von Alzheimerpatienten, sowie älteren Kontrollpersonen [22]. Lediglich in einer von sechs Hippocampus-Proben von jüngeren Personen konnte die Untereinheit $\beta 1i$ detektiert werden, woraus Mishto et al. schlussfolgerten, dass die Immunproteasom-Induktion altersabhängig erfolgt. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Untersuchung des Cortexgewebes von Alzheimerpatienten und entsprechend alten Kontrollprobanden, kein Immunproteasom gefunden [23]. Bellavista et al. (2008) fanden bei ihrer Untersuchung in Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) im Cortexbereich sowie im Cerebellum die Immunproteasom-Untereinheit $\beta 1i$ (LMP2). In ihren Arbeiten mit HD94 Mäusen, einem klassischen Mausmodell für die Huntington Erkrankung, konnten Díaz-Hernández et al. (2003) eine Immunproteasom-Induktion in betroffenen Hirnbereichen (Cortex und Striatum) mittels Immunhistologie und Westernblot detektieren, die sie auch in Hirnproben von Huntington-erkrankten Personen nachweisen konnten [24]. Dabei wurden die Immunproteasom-Signale hauptsächlich in Neuronen und vereinzelt auch in Astrozyten gefunden. Bei ihren Experimenten in ALS-(Amyotrophe Lateralsklerose) Mäusen sahen Puttarparti et al. (2005) eine vermehrte Bildung von Immunproteasom im Rückenmark mittels Westernblot Analyse [25]. Die Immunhistologie zeigte eine Induktion vor allem in Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia). Im Rückenmark von zwei Wochen alten ALS- und Kontroll-Tieren wurde Immunproteasom in gleichen Mengen gefunden, wodurch man zu dem Schluss kam, dass sich die Immunproteasom-Expression altersabhängig verändert.

1.2 Astrozyten

Astrozyten sind eine Untergruppe der Gliazellen, zu denen auch die Oligodendrozyten und Mikroglia gezählt werden. Astrozyten kommen ausschließlich im Zentralnervensystem vor und leiten sich während der Embryonalentwicklung vom Neuralrohr bzw. dem Neuroektoderm ab. Mit der Zunahme an Komplexität des ZNS nimmt auch das Astrozyten-Neuronen-Verhältnis zu, wobei es zwischen den verschiedenen Hirnbereichen variieren kann [26]. Im humanen Gehirn können Gliazellen bis zu 90% der Zellen ausmachen [27].

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich speziell mit dem Proteasom in Astrozyten, die aufgrund ihrer hohen Zellanzahl und ihrem engen Kontakt zu Neuronen, für die sie

lebenswichtige Funktionen (siehe Funktionen von Astrozyten) ausführen, geradezu prädestiniert sind, in neuronale Erkrankungen involviert zu sein.

1.2.1 Funktionen von Astrozyten

Astrozyten erfüllen in erster Linie klassische *housekeeping* Funktionen, wie den Nährstofftransport zu den Neuronen und den Abtransport von neuronalen Stoffwechselprodukten [28, 29]. Sie haben die Aufgabe der Nährstoffspeicherung (Glykogen) und -konversion (Glukose => Lactat) für Neurone [30], sowie die Aufrechterhaltung eines optimalen Ionen- und pH Milieus [29]. Zudem sind sie an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beteiligt [31, 32] und induzieren die Synapsenbildung der Neurone [33]. Astrozyten sind auch in der Lage, synaptische Signale zu modulieren [34, 35, 36, 37, 38] bzw. zu ermöglichen, indem sie Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt (z.B. Glutamat, Dopamin) aufnehmen und abbauen. Der enge Kontakt zu den Neuronen sowie die Bewältigung von essentiellen Aufgaben kann bei Fehlfunktionen von Astrozyten neuronale Erkrankungen auslösen.

Ein Beispiel hierfür beobachteten McPherson et al. (2006) bei ihren Versuchen mit transgenen Mäusen, die β -Galaktosidase in Astrozyten exprimieren. Nach Injektion von β -gal spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) kam es zu einem Astrozytensterben im Kleinhirn, dem ein Neuronensterben folgte. Generell wurden Astrozyten, die im Gehirn β -Galaktosidase exprimierten schnell von CD8⁺ T-Zellen attackiert. Eine größere Anzahl an Immunzell- Infiltraten konnte auch im Bereich des Hippocampus nachgewiesen werden [39].

1.2.2 Astrozyten und der Schutz vor Infektionen

Neben den oben genannten Aufgaben sind die Astrozyten auch am Schutz vor Infektionen im ZNS beteiligt [1, 40, 41, 42, 43]. Dieses äußert sich z.B. durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation [44, 45, 46, 47, 48], die in der Literatur immer noch umstritten ist, da viele Untersuchungen hierzu lediglich *in vitro* erfolgt sind [49]. Einige Untersuchungen legen nahe, dass sie einer vorherigen Stimulation durch INF γ bedürfen, bevor es zu einer MHC Expression kommt, in deren Verlauf auch co-stimulierende Moleküle hochreguliert werden [50]. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie vollkompetente antigenpräsentierende Zellen (APC's) sind, wenn sie in einem annähernd gleichzahligen Verhältnis mit T-Zellen vorliegen, [50]. Astrozyten regulieren auch T-Zellen, wobei sie neben ihrer APC-Funktion auch proliferationshemmend wirken [51]. Darüber hinaus belegen neuere Untersuchungen [42, 44]

, dass Astrozyten bereits im Ruhezustand verschiedene *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR) exprimieren, was sie zur Erkennung von viralen und bakteriellen Erregern befähigt. Astrozyten werden generell nicht als professionelle APC's angesehen. Es wird angenommen, dass die Astrozyten als ein Bestandteil der BHS, eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des Eintretens von Blutzellen über die BHS spielen [52] . Astrozyten sezernieren zusätzlich neurotrophe Faktoren und beeinflussen die Aktivierung von Mikrogliazellen / Makrophagen [53] . Sie stellen auch eine Hauptquelle für Chemokinproduktion im Gehirn dar [53, 54, 55, 56] . Darüber hinaus sind sie in der Lage proinflammatorische Cytokine wie Interleukin-1, -6 -12 und 23, sowie *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) zu sezernieren [1, 40, 41, 42, 44] . Zusätzlich zu ihren proinflammatorischen Funktionen, gibt es auch viele Arbeiten, die eine anti-inflammatorische Funktion von Astrozyten zeigen [1, 57] . Diese duale Rolle der Astrozyten zeigt ihre vielfältigen Einflussmöglichkeiten in einer pathologischen Situation des ZNS. So können sie durch ihr Verhalten eine Entzündung und daraus resultierende Schäden verstärken oder verhindern bzw. lindern. Durch diese potentiellen Einflussmöglichkeiten spielen sie eine zentrale Rolle in inflammatorischen neuronalen Erkrankungen wie Multipler Sklerose [1] . Ein Tiermodell dieser Erkrankung ist Hauptgegenstand der Untersuchung dieser Arbeit.

1.2.3 Das Proteasom in Astrozyten

Bisher existiert nur eine Veröffentlichung, die sich mit der Charakterisierung des 20S Proteasoms in humanen Glioblastomen beschäftigt. Piccinini et al. [58] entdeckten bei der immunhistochemischen Untersuchung von 18 humanen Glioblastomen und entsprechenden Kontrollgeweben Immunproteasom-Untereinheiten, die in 12 der 18 Glioblastome verstärkt exprimiert wurden.

Andere bisherige Untersuchungen zum Proteasom im ZNS (siehe das Proteasom im ZNS) erfolgten vornehmlich mit Gewebe-Extrakten, die eine Mischung aus Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Endothelzellen darstellen. Bei diesen Untersuchungen wurde hauptsächlich Standardproteasom gefunden. Da die Astrozyten einen Großteil des Hirnvolumens ausmachen, liegt die Vermutung nahe, dass auch sie überwiegend Standardproteasom besitzen.

1.3 Multiple Sklerose und ihr Erkrankungsmodell EAE

1.3.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten entzündlichen Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie hat einen schubförmigen oder chronisch progredienten Verlauf, bei dem es zur Demyelinisierung von verschiedenen Bereichen im ZNS kommt. Je nach befallener Region des ZNS kommt es zu den unterschiedlichsten klinischen Symptomen und diese führen im Laufe der Erkrankung regelmäßig zu bleibenden Behinderungen. Die Ätiologie für die Entstehung der Multiplen Sklerose konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, allerdings gibt es deutliche Hinweise auf einen autoimmunen Erkrankungsvorgang, der sich gegen das Myelin des ZNS bzw. Oligodendrozyten richtet. Dabei spielen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort eine Rolle [59] .

Neuere Arbeiten legen den Schluss nahe, dass es sich bei MS um eine heterogene Erkrankung handelt, mit unterschiedlichen Ursachen für eine Demyelinisierung [60] . Bei einer Untersuchung von 235 aktiv demyelinisierenden Läsionen konnten vier Erscheinungsformen aufgrund von unterschiedlichen Ursachen für die Demyelinisierung unterschieden werden. Form I und II können im Tiermodell reproduziert werden. Während bei ihnen die Myelinscheiden das Hauptziel der Zerstörung sind, scheinen bei den Formen III und IV die Oligodendrozyten selbst zerstört zu werden. Letztere konnten bisher im Tiermodell noch nicht eindeutig reproduziert werden [60] . Die autoimmune Gewebsschädigung kann sowohl durch autoreaktive T- [61] als auch B-Zellen [62] verursacht werden. Ein zur Zeit diskutiertes Modell für die MS-Entstehung geht davon aus, dass aus der Peripherie reife antigenspezifische oder kreuzreaktive T- und / oder B-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Autoantigen exprimierende Hirnzellen attackieren. Dabei findet man CD4⁺ T-Zellen vor allem in perivaskulären Zellansammlungen (*Cuffs*) und in den Randbereichen von MS-Läsionen, wohingegen die CD8⁺ Zellen ins Parenchym einwandern und im Zentrum von Läsionen zu finden sind, wo sie mit MHC-Klasse-I präsentierenden Zellen reagieren. [63] .

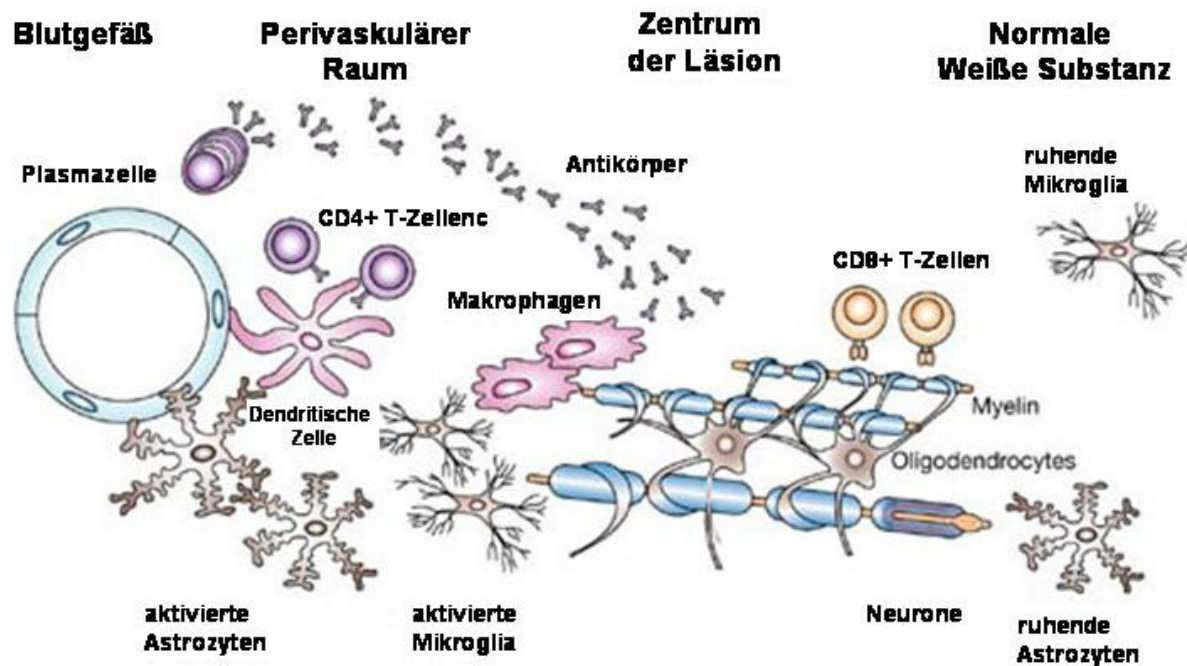


Abb. 3: Immunpathologie der Multiplen Sklerose. T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen passieren die Blut-Hirn-Schranke. CD4+ Zellen befinden sich hauptsächlich im perivaskulären Raum. Diese Zellen werden von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und Mikroglia reaktiviert und entlassen Cytokine und andere inflammatorische Mediatoren, wodurch sie Makrophagen ins Gewebe rekrutieren. CD8+ Zellen hingegen wandern ins Gewebe ein, wo sie proinflammatorischen Molekülen abgeben und MHC-Klasse-I exprimierende Zellen attackieren. B-Zellen findet man hauptsächlich im perivaskulären Raum und in der Hirnhaut, wo sie Antikörper sekretieren, die mit Zelloberflächenproteinen von Neuronen oder Oligodendrozyten reagieren und damit eine Komplement-Kaskade auslösen oder aber die Antikörper vermittelte Phagozytose durch Makrophagen auslösen. (entnommen Hemmer 2006 und verändert)

Zytotoxische CD8+ T-Zellen können direkt oder indirekt Gewebsschäden hervorrufen [64]. CD4+ T-Zellen vom Subtyp T_H1 tragen durch Aktivierung von Makrophagen indirekt zur Gewebsschädigung bei. CD4+ T_H2 Zellen wiederum steuern durch die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen zur Gewebsschädigung bei [65]. Neben der Hypothese, dass MS eine Autoimmunerkrankung ist, gibt es aber auch Hinweise für virale und bakterielle Ursachen. Allerdings ist diese Betrachtungsweise der MS Ätiologie in den unterschiedlichen Arbeitsgruppen noch sehr umstritten [66].

1.3.2 Das murine Erkrankungsmodell der MS: Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist das am häufigsten eingesetzte Tiermodell zur Untersuchung der Pathologie der MS [67, 68]. Dabei spiegelt sie die unterschiedlichen Facetten der Pathologie dieser Krankheit zu einem großen Teil wieder. Je

nach Mausstamm, verabreichtem Agens und Applikationsweg, kann man verschiedene Formen der EAE auslösen. Zwar ähnelt keines der Modelle in allen Punkten der MS, dennoch konnten in den letzten Jahren wertvolle Rückschlüsse auf die Pathogenese der Krankheit beim Menschen gezogen werden [68, 69, 70] .

Die EAE kann aktiv durch Injektion verschiedener Antigene oder passiv durch Transfer antigenspezifischer Zellen induziert werden [68, 71, 72, 73, 74] . Je nach Wahl des Tierstamms und Antigens verläuft sie als akute oder chronisch-rezidivierende, entzündliche und zum Teil auch demyelinisierende ZNS Erkrankung mit axonaler Schädigung. Aufgrund der großen Heterogenität der Tiermodelle sowie der auslösenden Faktoren ist der zu verwendende Tierstamm, das Agens und der Applikationsweg speziell in Hinsicht auf die Fragestellung mit größter Sorgfalt zu wählen. In der vorliegenden Arbeit wurden C57BL/6 (H-2^b) Mäuse für die EAE verwendet, welche durch aktive Immunisierung mit murinen MOG 35-55 Peptid induziert wurde. Der Grund für die Verwendung dieses Modells liegt in einer vornehmlich CD8+-abhängig vermittelten Inflammation [68] .

Zur näheren Charakterisierung potentieller Autoantigene der EAE wurde eine Vielzahl von Experimenten mit unterschiedlichen Immunisierungsansätzen durchgeführt. Schon früh wurde erkannt, dass eine EAE durch Injektion von Gesamtmyelin oder gereinigten Myelinbestandteilen induziert werden kann. Desgleichen können auch Antigene, die nicht Myelinbestandteil sind, Ziel der Autoimmunreaktion werden, z. B. das Protein S-100, ein Signalprotein in Gliazellen [75] . Mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) konnte in verschiedenen Rattenstämmen annähernd das gesamte Spektrum der MS Pathologie reproduziert werden. Daher wird dieses als eines der bedeutsamsten Antigene bei der Entstehung von zentralen Autoimmunerkrankungen angesehen [76] .

Eingehende Untersuchungen befassten sich mit der Frage, welche T-Zellepitope des MOG autoantigene Eigenschaften haben [77] . Dabei stellte sich speziell das MOG Peptid 35-55 (MOG35-55) als enzephalitogen und Auslöser permanenter neurologischer Defizite heraus. In C57BL/6 (H-2^b) Mäusen entwickelte sich nach 12-14 Tagen eine chronische Erkrankung mit überlagernden Schüben [77, 78, 79] . Sun et al. [80] und Huseby et al. [81] wiesen als erste nach, dass diese EAE auch durch CD8+ T-Zellen hervorgerufen wird. Inzwischen haben verschiedene Arbeitsgruppen versucht, das enzephalogene Epitop in MOG35-55 zu identifizieren. Mendel et al. (1996) lokalisierten ein MHC-Klasse-II Epitop mit der Kernsequenz MOG40-48 [82] , was von Sweenie et al. 2007 bestätigt wurde [83] . Sun et al. [84] definierten MOG40-54 als den Bereich, der CD8+ Zellen stimuliert und EAE auslöst.

Ford und Evavold [85] postulierten MOG37-46 als das minimale CD8+ T-Zell-Epitop, welches von MOG spezifischen T-Zellen erkannt wird.

1.4 CD8+ T-Zellen in inflammatorischen Erkrankungen: pathogene und regulierende Funktion

Während sich anfänglich das Hauptaugenmerk bei MS und ihrem Erkrankungsmodell der EAE auf die Rolle von CD4+ T-Zellen richtete, so haben jüngere Forschungsergebnisse aus verschiedenen Arbeitsgruppen CD8+ T-Zellen ins Blickfeld des Interesses rücken lassen [74, 86, 87, 88]. In mehreren Untersuchungen fanden sich sowohl Hinweise auf regulierende als auch auf pathogene Funktionen der CD8+ T-Zellen.

In humanen MS Läsionen dominieren CD8+ Zellen und man kann eine gesteigerte MHC-Klasse-I Expression auf Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen, je nach schwere und Aktivität der Läsionen, beobachten. Somit sind alle Zellen des ZNS potentielle Ziele für auf MHC-Klasse-I gerichtete cytotoxische T-Zellen [89]. Die pathogene Rolle von Myelin spezifischen CD8+ T-Zellen wurde in mehreren EAE-Tiermodellen reproduziert. Der Transfer von CD8+ enzephalitogenen, MOG spezifischen T-Zellen in C57BL/6 Mäuse führte zu schwerer und permanenter Krankheit der Tiere [80, 81]. Doch auch regulierende Funktionen von CD8+ T-Zellen konnten anhand von Transferversuchen, Depletion von CD8+ T-Zellen oder in so genannten *knock-out* Tiermodellen nachgewiesen werden.

In CD8 *knock-out* Mäusen war nach Induktion einer EAE die Krankheitssymptomatik zunächst milder ausgeprägt als in Kontrolltieren. Allerdings verlief die EAE bei den *knock-out* Mäusen, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, chronisch und mit erhöhter Schubrate [90]. Deshalb wurde in diesem Modell auf sowohl eine pathogene als auch regulierende Funktion der CD8+ T-Zellen geschlossen. Montero et al. [91] zeigten in C57BL/6 Mäusen, dass bei einer durch MOG35-55 induzierten EAE die Injektion von anti-CD4-Antikörpern den Ausbruch der EAE verhindert, nicht jedoch bei Verabreichung von CD8-Antikörpern. Es wurde geschlussfolgert, dass CD4+ Zellen die EAE induzieren und CD8+ Zellen eher regulierend bzw. inhibierend wirken. Abdul-Majid et al. [92] wiesen nach, dass sowohl in CD4-/- als auch CD8-/- DBA1 Mäusen eine EAE induziert werden kann. Allerdings war der Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp milder. Eliminierung von CD4+-Zellen in CD8-/- Mäusen führte auch in diesem Modell zu einem Schutz vor EAE, wohingegen ein Entzug von CD8+ Zellen in CD4-/- Mäusen zu einem selteneren Ausbruch von EAE führte. Auch in den WT Mäusen führte eine CD4 Bindung zu einem Ausbleiben von EAE, jedoch nicht bei

Eliminierung von CD8⁺-Zellen. Abdul-Majid und Kollegen interpretieren ihr Ergebnis dahingehend, dass in Abwesenheit von CD4⁺-Zellen eine EAE auch CD8⁺ vermittelt ausgelöst werden kann.

1.5 Zielsetzung

Dem Proteasom fällt aufgrund seiner Funktion Peptide für die MHC-Klasse-I Präsentation bereit zu stellen eine zentrale Bedeutung in der adaptiven zellulären Immunantwort zu. Häufig geht hiermit eine Anpassung des Proteasoms einher, indem Standard- gegen Immunproteasomen ausgetauscht werden. Ob dieser entzündungsbedingte Prozess auch im ZNS erfolgt, ist aber noch weitgehend unbekannt. Zur Beantwortung dieser Frage sollte untersucht werden, ob Astrozyten die Fähigkeit haben, ihr Proteasom-System z.B. durch Einwirkung von immunmodulatorischen Cytokinen, einer veränderten immunologischen Situation anzupassen. Diese Untersuchungen wurden am Proteasom-System primärer Astrozyten aus Mäusen sowie einer murinen Astrozyten-Zelllinie (TSA-3) unter normalen Wachstumsbedingungen und unter dem Einfluss verschiedener Stimuli (INF γ , LPS) durchgeführt. Darüber hinaus war es ein Ziel der Arbeit das Verhalten des Proteasoms in einer tierexperimentell pathologischen Situation zu charakterisieren, und zwar im Modell der Multiplen Sklerose, der experimentell induzierten autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Da die motorischen Ausfallerscheinungen im Rahmen einer MS durch autoimmun-bedingte Läsionen im ZNS hervorgerufen werden, wurde untersucht, ob sich das Proteasom-System im Hirngewebe von Mäusen nach Induktion der EAE im Sinne einer Cytokin-induzierten Veränderung der pathologischen Situation anpasst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte:

Blockthermostat (Thermomixer comfort)	Eppendorf
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektrophorese Einheit Mighty Small II SE250/SE260	Hoefer
OpsysMR Plattenreader	Dyner Technologies
Feinwaage MC1	Sartorius
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software	SLT
FPLC	Amersham Pharmacia
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	puffer hubbard
Homogenisator	Braun
Konfokales Mikroskop (SPE Leica)	Leica
Kryostat	Leica
Kühlzentrifuge SIGMA 3K15	Sigma
Kühlzentrifuge Eppendorf 5402	Eppendorf
Kühlzentrifuge RC 5C	Sorvall
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph
Mikrowelle Micro Chef FM 8935	Moulinex
Stromgeber DC PS3000	Hoefer
pH-Meter pH Level 1	InoLab
Photometer UV-2102 PC Software UV-X101 PC	Shimadzu
Pipetten	Gilson
Pipettus-Akku	Hirschmann
Rotor TLA-120.2	Beckman
Rotor SA-300	Sorvall
Rotor SW40	Beckman
SMART-System	Amersham Pharmacia
Schüttler	Heidolph Instrumente
Semidry-Blot-Kammer	BioRad
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Stickstofftank	Taylor-Wharton
Ultraschall Sonoplus GM70	Bandelin
Ultrasenzentrifuge Beckmann TL-100	Beckmann Coulter
Ultrasenzentrifuge Beckman L-70	Beckmann Coulter

Vortexer VF2
 Waage BP210OS
 Wasserbad TWB 12
 Wasserbad U3
 Zellkultur-Inkubator

Heidolph Instrumente
 Sartorius
 Julabo
 Julabo
 Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Centricon® Plus-20
 Combitips
 Einmalspritzen
 Eppendorf Reagiergefäß
 Kryoröhrchen
 Mikrotiter-Platten, schwarz und klar
 Molekulargewichtsstandard, prestained
 Multiply-Pro Gefäß 0,5ml, PP
 Petrischalen
 Protein A Sepharose CL-4B
 Protein G Sepharose fast flow
 Reagenzglas 3,5ml und 12ml, PS
 Röntgenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR
 Rotilabo®-Mikrotest-Platten aus Polystyrol, U-Profil
 PVDF-Membran Immobilon-P
 Sterilfilter 4,5; 0,2 µm
 Ultrazentrifugenröhrchen
 Whatman-Papier
 Zellkultur-Plastikwaren, steril Falcon,

Millipore
 Eppendorf
 Braun
 Eppendorf
 Nunc
 Greiner
 Fermentas
 Sarstedt
 Greiner
 GE Healthcare
 GE Healthcare
 Sarstedt
 Kodak
 Roth
 Millipore
 Schleicher & Schuell
 Beckman Coulter
 Schleicher & Schuell
 Greiner

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Acrylamid (30 %, 29:1)
 Agarose
 Ammoniumchlorid
 Ammoniumsulfat
 Ammoniumpersulfat (APS)
 beta-Mercaptoethanol
 bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)
 Bromphenolblau
 BSA, Fraktion V
 Coomassie Brilliant Blue R250
 Coomassie Plus Protein Assay
 Coumarinsäure
 DEAE Sephacel

Roth
 Serva
 Serva
 AppliChem
 Serva
 Serva
 Serva
 AppliChem
 Serva
 Serva
 Pierce
 Sigma
 Amersham

DEPC	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
DMSO	Fluka
DTT	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	AppliChem
fluorogene Peptid-Substrate	Bachem Biochemica bzw. Calbiochem
Formaldehyd	Amersham
Glycerol	Roth
HEPES	Roth
ImmunoMount	Thermo Electron Corporation
Isopropanol	Baker
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Kalciumchlorid	Sigma
Lab-trol-E normal	Merz-Dade Switzerland
L- Leucinmethylester	Sigma
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Fluka
Magermilchpulver	Difco
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	AppliChem
Methanol	Baker
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Sigma
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumthiosulfat	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Serva
PBS (Tabletten)	Gibco
Peptidsubstrate	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie
SDS	AppliChem
Sorbitol	Sigma
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-Amin)	Serva
Tissue-Tek® Compound	Sakura
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka
Tris	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Trypanblau-Stammlösung	Sigma
Tween20	Serva
Wasserstoffperoxid	Roth

Ziegen Serum Gibco,
Zephiranchlorid, 17 %

Invitrogen Cooperation
ICN

2.1.4 Kits

ECL Advance Western Blotting Detection Reagents
HighPure RNA Isolation Kit
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit
TSA Kit #12
qPCR Master Mix

GE Healthcare
Roche
Roche
Invitrogen
Eurogentec

2.1.5 Zellkulturmedien

DMEM
Penicillin/Streptomycin
fötales Kälberserum (FCS)
L-Glutamin
Trypsin EDTA

Biochrom
Seromed
Biochrom
Biochrom
Gibco BRL

2.1.6 Chromatographie-Materialien und Fertigsäulen

DEAE Toyopearls 650 S
MiniQ PC 3.2/3 (240 µl)
Mono Q 5/50 GL (1ml)
Mono Q HR 5/5 (1ml)
Resource 15Phe 4.6/100 PE (1,7ml)
Superose 12 prep grade HR 10/30 (125ml)
Phenyl Superose PC 1.6/5 (100µl)

Tosoh Biosep GmbH
GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Herkunft	Anwendung	Verdünnung
anti-delta / $\beta 1$ (K43/7)	AG Prof. Kloetzel	WB	1:1000
anti-LMP2 / $\beta 1i$ (ab3328)	Abcam	WB	1:1000
anti-LMP7 / $\beta 5i$			
K63	AG Prof. Kloetzel	WB	1:2000
ab3329	Abcam	WB / IF	1:1000 / 1: 200
anti-MB1 / $\beta 5$			
SJJ3	Saldano Ferrone [93]	WB	1:5000
ab3330	Abcam	WB	1:1000
anti-Z / $\beta 2$ (mcp168)	Dr. K. Hendil	WB	1:1000
anti-Mecl-1 / $\beta 2i$ (K65)	AG Prof. Kloetzel	WB	1:1000
Anti-Rattenmuskel Proteasom (Serum 37)	Dahlmann (1985) [7]	IF	1:100
anti-20S (K08)	AG Prof. Kloetzel	IP	
anti-GFAP	Serotec	IF	1:400
Goat anti-mouse-cye3	Molecular Probes	IF	1:500

Hoechst 33258	Sigma	IF	1:5000
anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt (goat anti-rabbit)	Dianova	WB	1:10.000
anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt (sheep anti-mouse)	Dianova	WB	1:10.000

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1.1 Gewinnung von Zell- und Gewebe-Extrakten

- Lysepuffer: TEAD (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, 1 mM DTT), 0,1 % (v/v) Triton-X 100

2.2.1.1.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Die Zellen wurden nach dem Ablösen einmal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zur Verwendung bei –80°C gelagert. Die Zellen wurden in 200-500 µl Lysepuffer aufgenommen und dann viermal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und jeweils bei 25°C wieder aufgetaut. Die Proben wurden bei 14000 g für 30 min (4°C) abzentrifugiert und der Überstand als Zell-Lysat weiterverwendet.

2.2.1.1.2 Herstellung der Organhomogenate für die Immunpräzipitation von 20S Proteasomen

Kleine Gewebemengen wurde in 300-500 µl Lysepuffer im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und anschließend bei 14.000 g für 30 min (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die IP verwendet.

2.2.1.1.3 Herstellung der Organhomogenate bzw. der TSA-3 Zell-Lysate für die Präparation von 20S Proteasomen

Für die Präparation von 20S Proteasomen aus verschiedenen Organen wurden insgesamt 2-3 g Gewebe im halb-gefrorenen Zustand in dem 3-5fachen Volumen des Gewichtes in gekühlten Lysepuffer in einem Dounce-Homogenisator durch 10 Stöße auf Eis aufgeschlossen und das Homogenat bei 14.000 g für 45 min (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert.

Das gleiche Vorgehen wurde auch für den Aufschluss der TSA-3 Zellen verwendet. Für die Präparation wurden $8 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^9$ Zellen verwendet.

2.2.1.2 Proteasomen Präparation

2.2.1.2.1 Präparation von 20S Proteasom aus Organhomogenaten und Zell-Lysat

- TEAD: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, 1 mM DTT

Das Organhomogenat bzw. Zell-Lysat (aus TSA-3 Zellen) wurde auf eine mit TEAD Puffer äquilibrierte DEAE-Toyopearl-650S Säule (10 ml Gelbett) aufgetragen (Flußrate 1ml/min). Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina TEAD gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen 100 ml Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl in TEAD. Es wurden 65 Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt.

Fraktionen, die chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Substrat Suc-LLVY-MCA) enthielten, wurden vereinigt und darin enthaltene Proteine mittels Ammoniumsulfat gefällt. Dazu wurde Ammoniumsulfat bis zu einer 75%igen Sättigung unter ständigem Rühren auf Eis hinzu gegeben und die gefällten Proteine anschließend bei 30.000 g und 4°C für 45 min, im SA-300 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde in TEAD-Puffer gelöst und anschließend auf eine Gelfiltrationssäule geladen.

Die Gelfiltration wurde in einer FPLC-Anlage auf einer präparativen Superose 6B Säule (125 ml Gelbett) mit TEAD-Puffer durchgeführt. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Nach dem Lauf wurden die Fraktionen mit proteolytischer Aktivität gepoolt. Anschließend erfolgte eine weitere Anionenaustauschchromatographie an einer MonoQ 5/50 GL in dem FPLC – System. Der Auftrag der Probe erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Zur Elution wurde ein linearer 60 ml Gradient von 0-0,5M NaCl in TEAD verwendet und 1ml Fraktionen gesammelt, von denen die mit proteolytischer Aktivität vereinigt wurden. Als letzter Reinigungsschritt erfolgte eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie im SMART-System. Dazu wurde die Probe mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1,2 M (NH₄)₂SO₄ versetzt und auf eine Phenylsuperose PC 1.6/5 aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden durch einen absteigenden 1,5 ml Ammoniumsulfat-Gradienten von 1,2 M bis 0 M (NH₄)₂SO₄ eluiert. Es wurden 30 µl Fraktionen gesammelt, von denen die mit proteolytischer Aktivität gepoolt wurden. Das so isolierte Proteasom wurde über Nacht gegen TEAD dialysiert und anschließend die spezifischen proteolytischen Aktivitäten bestimmt.

2.2.1.2.2 Isolation von 20S Proteasomen aus primären Astrozyten

Jeweils 500 µl Zell-Lysat wurden auf einen Glycerol-Gradienten (20-40%) geladen. Die Zentrifugation erfolgte bei 100.000 g und 4°C für 24 h im SW40 Rotor. Daraufhin wurde der Gradient in 0,3 ml Fraktionen fraktioniert und die Fraktionen hinsichtlich ihres Gehalts an proteolytischer Aktivitäten getestet und gepoolt. Der Proteasom-haltige Pool wurde 10-fach mit TEAD verdünnt, filtriert und dann auf eine MiniQ PC3.2/3 im SMART-System geladen. Die Elution erfolgte mit einem 6 ml linearen Gradienten von 0-0,5 M NaCl in TEAD. Die 30 µl Fraktionen mit proteolytischer Aktivität wurden vereinigt und über Nacht gegen TEAD dialysiert.

2.2.1.2.3 Auftrennung von 20S Proteasom-Subtypen

Zur Auftrennung in Subtypen wurden die isolierten 20S Proteasomen erneut auf eine MiniQ PC3.2/3 aufgetragen und mit einem linearen 7 ml Gradienten von 0-0,5 M NaCl in TEAD eluiert.

2.2.1.3 Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten

Der Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten nach Isolation der Proteasomen erfolgte mit 100 ng Proteasom / Testansatz Mikrotiterplatten. Die in TEAD Puffer gelösten Substrate Suc-LLVY-AMC, BzVGR-AMC und Z-LLE-AMC wurden jeweils in den Endkonzentrationen 100 μ M, 200 μ M und 200 μ M im Test eingesetzt. Die Ansätze wurden bis zu 150 min bei 37°C inkubiert und das enzymatisch freigesetzte AMC im Fluorimeter (Fluoreszenzplatten-Reader FluoStar) gemessen. Folgende Messparameter wurden gewählt:

Extinktion: 355 nm, Emission: 460 nm, Anzahl der Blitze: 20, Verstärkung: 10.

2.2.1.4 Proteinpräzipitation mittels TCA

Die Proben wurden mit TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt und 20-40 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14 000 g für 30-60 min bei 4°C zentrifugiert und die Pelletts mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen.

2.2.1.5 Ethanol-Fällung von Proteinen für die 2D-PAGE

Die Proteinlösung wurde mit dem 2,5-fachen Volumen EtOH versetzt, gemischt und 2 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation bei 14000 g, für 60 min, bei 4°C gefällt und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Die luftgetrockneten Pellets wurden bei 4°C aufbewahrt.

5-50 μ g Proteasom wurden mittels hochauflösender 2D-PAGE (Groß- und Kleingeltechnik nach [94, 95] durch Dr. Ursula Zimny-Arndt (MPI) separiert und gefärbt bzw. auf PVDF-Membranen geblottet.

2.2.1.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

- Trenngelpuffer nach Laemmli (4 fach konzentriert): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
- Sammelgelpuffer nach Laemmli (4 fach konzentriert): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,8% (w/v) SDS
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,3-8,5
- Acrylamid-Stammlösung: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
- 1 fach SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (w/v) Glycerol; 5% (v/v) beta-Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Zusammensetzung für 2 x 0,75 mm Gele für das Hoefer-System:

Trenngel (12,5 %): 4,7 ml Acrylamidlösung., 2,9 ml Trenngelpuffer, 4,1 ml H₂O, 31 μ l APS, 31 μ l TEMED

Sammelgel (3,5%): 0,75 ml Acrylamidlösung, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 3 ml H₂O, 15 μ l APS, 15 μ l TEMED

Für die Auftrennung in der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden die Proben in Probenpuffer 5 min bei 90°C denaturiert, 2 min bei

14000 g zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Während der Elektrophorese wurde bei dem Durchlaufen der Proben durch das Sammelgel eine konstante Spannung von 80 Volt und während des Durchlaufens des Trennegels eine konstante Spannung von 120 Volt angelegt. Zur Orientierung während der Elektrophorese und zur späteren Einordnung der Molekulargewichte wurden 5 µl des *Prestained Protein Marker (broad range)* von Fermentas aufgetragen.

2.2.1.7 Westernblot Analyse und Immunodetektion

- Transfer-Puffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin
- TBS: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl
- TBS-T: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% (v/v) TWEEN-20
- Blockierlösung: TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 1 mM NaN₃
- Antikörperlösung: TBS-T mit 2,5 % (w/v) Magermilchpulver und 1 mM NaN₃

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen und dort durch spezifische Antikörperbindung identifiziert. Der Westernblot wurde nach dem Semy-Dry Verfahren durchgeführt. Dazu wurde die Membran mit unverdünntem Methanol aktiviert und das Gel und die Membran wurden zwischen je 3 Lagen in Transfer-Puffer getränktem Whatman-Papier in die Semy-Dry Apparatur mit der Membranseite zur Anode gelegt. Der Transfer erfolgte bei 15 Volt für 35 min.

Überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit Magermilchpulver (Blockierlösung) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) bzw. bei 4°C über Nacht (ü.N.) abgesättigt. Die Inkubation mit primärem Antikörper (verwendete Antikörper s. 2.1.7.) wurde für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in Antikörperlösung durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min mit TBS-T gewaschen, für 1 h mit sekundärem Antikörper inkubiert (s. 2.1.7) und erneut zweimal 10 min mit TBS-T gewaschen.

Die Detektion der Antikörperreaktion wurde mit *ECL* durchgeführt und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.2.1.7.1 ECL Detektion

- Lösung A: 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 22 µl 90 mM Cumarinsäure gelöst in DMSO und 50 µl 250 mM Luminol (3-Aminophtalhydrazid) gelöst in DMSO
- Lösung B: 5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 3 µl 30% (v/v) H₂O₂

Filme: Kodak X-Omat DS Filme

Die Lösungen wurden vor der Reaktion jeweils frisch zubereitet und im Dunkeln aufbewahrt. Die Lösungen wurden zusammengegeben und die Membran 1 min darin inkubiert. Je nach Intensität erfolgte die Exposition der Filme einige Sekunden bis zu 10 min. Bei sehr schwachen Signalen wurde der ECL-Lösung zusätzlich 0,5 ml *ECL Advance Western Blotting Detection Reagents* zugesetzt.

2.2.1.8 Coomassie-Färbung von Proteinen in Acrylamidgelen

- Coomassie-Lösung: 0,1 g (w/v) Coomassie Brilliant blue R250, Essigsäure / Ethanol / H₂O Volumenverhältnis 1 : 5 : 4 (über Nacht in H₂O gelöst, filtriert)
- Entfärber: Ethanol / Essigsäure / H₂O im Volumenverhältnis 4,5 : 1 : 4,5

Für den unspezifischen Nachweis von Proteinen wurden die Polyacrylamidgele in Coomassie-Lösung mindestens 1 h bei RT vorsichtig geschwenkt. Die Gele wurden mit Entfärber so lange inkubiert, bis die Banden gut zu erkennen waren und der Hintergrund weitgehend farblos war.

2.2.1.9 Immunpräzipitation von Proteinen

- TEAD: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT; 1 mM NaN₃
- TBS: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl
- PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,2
- Protein A / G-Sepharose Suspension: Protein A- und G-Sepharose wurde zu gleichen Teilen gemischt und im Volumenverhältnis 1 : 1 mit PBS versetzt

Die Protein A / G-Sepharose Suspension wurde fünfmal mit PBS gewaschen und für 2 h mit 20 µg / ml BSA bei 4°C auf dem Rotator durchmischt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Die Immunpräzipitationen wurden aus Gesamtzelllysaten (100-300 µg) durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit TEAD Puffer verdünnt und mit 0,1 mg/ ml BSA für 5 min auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 3-5 µl Antikörper (K08) dazugegeben und die Probe für 4 h (bis ü.N.) bei 4°C auf gleiche Weise weiterinkubiert. Nach Zugabe von 40-50 µl Protein A- / G-Sepharose Suspension (ca. 20-25 µl Gel-Pellet) wurden die Proben für weitere vier Stunden bei 4°C auf dem Rotator inkubiert und anschließend gewaschen. Standardmäßig wurden Immunpräzipitationen zweimal mit 1 ml TBS und einmal mit MilliQ gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 g, für 2 min bei 4°C. Überschüssiges Wasser wurde mit einer Kanüle abgenommen. Die Sepharose Suspension wurde anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.2.1.10 Proteolytische Prozessierung von Modellpeptiden

- Verdauopuffer: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,8; 2 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT

Die *in vitro* Prozessierungsexperimente wurden mit dem Modellpeptid MOG29-61 (G K N A T G M E V G W Y R S P F S R V V H L Y R N G K D Q D A E Q A) durchgeführt. In den Verdauansätzen wurden 2 µg Proteasom eingesetzt sowie 20 µg Substrat. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 0 bis 24h und wurde durch Zugabe von TFA auf eine Endkonzentration von 0,3% TFA und Einfrieren bei -20°C gestoppt.

Die massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte erfolgt durch Frau K. Textorius-Taube oder Frau C. Keller an einer HPLC-ESI-Ionenfalle (LCQ Deca XP Max, ThermoElectron) gekoppelt mit einer HPLC (HP1100, Agilent) [96]

2.2.1.11 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Jeweils 10 µl der zu bestimmenden Probe wurden mit 100 µl der fertigen Gebrauchslösung Coomassie Plus Protein Reagenz (Pierce) versetzt und im Platten-Reader Dynex Opsys MR bei 595 nm gemessen.

2.2.1.12 Proteinidentifizierung

Zur Identifizierung der 20S Protesom-Untereinheiten wurden einzelne Spots aus Coomassie-gefärbten 2D-PAGE ausgestochen und durch Frau Dr. K. Janek oder Frau A. Niewinda (Institut für Biochemie) mittels Peptidmassen- Fingerprint-Analyse charakterisiert. Dafür wurden die Gelstücke zunächst gewaschen, ein tryptischer Verdau im Gel durchgeführt und die resultierenden Peptide mittels MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS) analysiert [96] .

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Hirngewebe

Für die Isolation von RNA wurden ca. 50 mg Gewebe mit dem „HighPureRNA Isolation Kit“ isoliert. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers (Roche Diagnostics). Die isolierte Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits (Roche Diagnostics). 1-2 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden mit 1 µM Oligo-dT-Primern in einem 13 µl Ansatz mit DEPC-H₂O 10 min bei 65°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit 2 µl dNTPs, 0,5 µl RNasin, 0,5 µl Reverse Transkriptase und dem dazugehörigen Puffer auf 20 µl gebracht. Die reverse Transkription erfolgte bei 55°C, 30 min mit anschließender Inaktivierung der Transkriptase für 5 min bei 85°C und darauf folgender Kühlung auf 4°C. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (nach Sambrook et al. (1989))

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte im Photometer durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀). Die Konzentration der DNA in µg/ml errechnete sich aus dem A₂₆₀-Wert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Multiplikationsfaktor 50. Die Konzentration der RNA in µg/ml errechnete sich aus dem A₂₆₀-Wert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Multiplikationsfaktor 40.

2.2.2.4 RealTime-PCR

Die RealTime PCR wurde in einem ABI PRISM 7000 durchgeführt unter Verwendung des qPCR Master Mix (Eurogentec). Es wurde jeweils ein Mastermix für jedes Zielgen sowie das Housekeeping-Gen angefertigt. Der Mastermix bestand aus 2 fach konzentriertem PCR

Mastermix (der Taq-Polymerase, dNTPs, Magnesiumchlorid und ROX enthält), den entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Forward- und Reverse-Primer Tab. 2), den fluorogenen Sonden (Probes) und aus sterilem Wasser (Tab. 3). Der Reaktionsansatz selbst besaß ein Volumen von 20 µL. Eine PCR beinhaltete 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus je 15 sec Denaturierung bei 95°C und Annealing bei 60°C besteht. Die relative Menge an spezifischer RNA wurde normalisiert auf GAPDH.

Tab. 2: Primer-Sets für die RealTime PCR. Die Primer wurden mit der Primer Express Software bestimmt und beinhalten ein Intron des Gens um zwischen cDNA und genomischer DNA unterscheiden zu können.

Name	Forward Primer	Reverse Primer	Probe	Amplicon (bp)
GAPDH	5'- ccagcctcgctcccgtagac -3'	5'- tggaacaatctccactttgc -3'	5'(Fam)- cggatttggccgtattgggcg -3'(TAMRA)	106
β1i / LMP2	5'- aggagtgccggcggttc -3'	5'- tcccaggatgactcgatggt -3'	5'(Fam)- ccatcactctggccatgaaccgaga -3'(TAMRA)	125
β5i / LMP7	5'- ctcggagctcgcacttc -3'	5'- gggccatctcaattgaacatt -3'	5'(Fam)- tgcagcccaccgcattctga -3'(TAMRA)	96
β2i / MECL1	5'- agaccggtccagccaaac -3'	5'- ctcaggatccctgctgtgatg -3'	5'(Fam)- tgacgctggaggtgcgca -3'(TAMRA)	78

Tab. 3: Einfacher RealTime PCR Reaktionsansatz für 20 µL zur Analyse der relativen Genexpression mittels TaqMan-PCR (Applied Biosystems).

Reagenz	
PCR Mastermix (x2)	10 µL
Forward Primer (10 µM)	1 µL
Reverse Primer (10 µM)	1 µL
Probe (5 µM)	1 µL
H ₂ O	2 µL
cDNA	5µL

Zur Berechnung der relativen Expression wurde das $\Delta\Delta C_t$ -Verfahren angewendet. Zuerst wurde die Differenz (ΔC_t) der ungemittelten C_t -Werte zwischen Housekeeping-Gen und Zielgen gebildet. Die relative Expression wird dann durch den negativen Exponenten des ΔC_t -Wertes von 2 kalkuliert und ergibt eine dimensionslose Zahl ($\Delta\Delta C_t$). Dieser ΔC_t -Wert spiegelt den Mittelwert aus 4-5 unabhängigen Experimenten einer Tiergruppe wider. Um eine relative Gen-Induktion darzustellen,

wurde aus diesen Ergebnissen noch ein Veränderungswert berechnet. Dabei wurde die Kontrolle als 1 gesetzt. Diese Auswertmethode setzt jedoch voraus, dass die Effizienz der Amplifikation durch die jeweiligen ausgewählten Bedingungen für die Primer- und Sondenpaare nahezu gleich sind. Wenn eine gleiche Effizienz erfüllt ist, kann von einer Verdopplung der Kopienanzahl von Zyklus zu Zyklus ausgegangen werden.

2.2.2.5 Affimetrix-Array-Hybridisierung

Die RNA-Isolation erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Aus je fünf verschiedenen Tieren einer jeden Gruppe (Kontrolle, OVA früh, OVA spät, MOG früh und MOG spät) wurde jeweils 2 µg Gesamt-RNA isoliert und die isolierte RNA der Tiere einer Gruppe gepoolt. Für die Hybridisierungsexperimente wurden Affimetrix *mouse whole genome 430 2.0 plus* Chips verwendet. Die Hybridisierung wurde von Signature Diagnostics AG durchgeführt.

2.2.3 Zellkulturmethoden und EAE-Experimente

TSA-3 (adhärent wachsend) : murine Astrozyten-Zelllinie

BV2 (adhärent wachsend) : murine Mikroglia-Zelllinie

2.2.3.1 Kultur von adhärent wachsenden Zellen

- Medien: DMEM Medium *high Glucose* (ohne Pyruvat mit 4,5 g/L Glucose) enthaltend 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ 10.000 µg/ml), 1% (v/v) 200mM L-Glutamin
- Medien: DMEM Medium *without Glucose* enthaltend 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ 10.000 µg/ml), 1% (v/v) 200mM L-Glutamin
- Einfrier-Medium: DMEM Medium/ FCS/ DMSO im Volumenverhältnis 4 : 4 : 2
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,2
- Ablösemedium: 1,47 mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,6 mM Na₂EDTA, Phenolrot (pH um 7,4)
- Trypanblau: 25% Trypanblau-Stammlösung in PBS (Volumenverhältnis 1 : 3)

TSA-3 bzw. BV2 Zellen wurden in DMEM Medium bei 37°C unter 5% CO₂ Atmosphärenkonzentration kultiviert. Das Wasser zum Befeuchten der Luft im Inkubator war mit 0,068 % Zephiranchlorid versetzt. Bei der Kultivierung wurde darauf geachtet das die Konfluenz 80% nicht übersteigt. Das Umsetzen erfolgte bei einer Dichte von ca. 70-80% Konfluenz an jedem 3-4 Tag. Zur Induktion einer Synthese von Immunproteasomen in den Zellen wurden dem Medium 100U rekombinantes murines γ-Interferon (Roche) pro ml Medium bzw. 1 µg LPS (Sigma) pro ml Medium zugesetzt und die Zellen damit 4 h und 24 h inkubiert.

2.2.3.2 Zellernte

Nach dem Absaugen des Mediums aus den Zellkultur-Flaschen wurde jede Flasche mit 10 ml PBS gewaschen. In jede Flasche wurden 5 ml Ablösemedium gegeben, die Flasche leicht geschwenkt und ca. 3 min stehen gelassen. Die Zellen wurden durch mehrmaliges vorsichtiges Pipettieren gelöst und in ein 50 ml Falcongefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 800 g und 4°C für 10 min wurde das Zellpellet in PBS gewaschen und die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Kammer durch Trypanblau-Färbung unter einem Mikroskop ermittelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden ca. 5×10^6 Zellen in 500 µl Medium und 500 µl Einfriermedium aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Der Gefrierprozess wurde bei -80°C in Einfrierboxen verlangsamt. Über längere Zeiträume wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden durch Schütteln und Erwärmen in der Hand zügig aufgetaut, sofort in 10 ml vorgelegtem DMEM Medium verdünnt und ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entsprechend ihres Wachstums subkultiviert.

2.2.3.4 Kultivierung von primären Astrozyten

Neugeborene Mäuse (P0 bis P2) wurden mit einem Skalpell dekapitiert, die Kopfhaut abpräpariert und die Schädeldecke mit einem Skalpell vorsichtig entlang der Mittellinie geöffnet. Das freigelegte Gehirn wurde entnommen und in D-MEM mit 4,5 g Glukose überführt, so dass das Großhirn unter dem Binokular präpariert werden konnte. Um die Hirnhäute zu entfernen, wurde das Großhirn über sterilisiertes Filterpapier gerollt und eventuelle Reste unter dem Binokular entfernt. Das Hirngewebe wurde durch Pasteurpipetten mit abnehmendem Kapillardurchmesser gepresst, so dass die Zellen vereinzelt wurden und anschließend in Poly-D-Lysin beschichteten Flaschen ausgesät werden konnten (ca. $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Hirn pro Flasche). Die Zellen hefteten sich über Nacht in den Kulturflaschen an. Die Zellen wurden anfänglich unter nahrungsreichen Wachstumsbedingungen mit 10% FCS und 4,5 g Glukose/L in DMEM kultiviert. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, um die Konzentration der von den Astrozyten abgegebenen Wachstumsfaktoren niedrig zu halten. Am zweiten bzw. dritten Tag wurden die Zellen für 45 min bis 1 Stunde mit 8 mM L-Leucinmethylester im Medium inkubiert, was die meisten Mikroglia-Zellen abtöten sollte. Die FCS-Menge in DMEM wurde auf 20% erhöht, dem Medium aber anstelle von Glucose 25mM Sorbitol hinzugefügt, um Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone zu eliminieren. Nach etwa 7 Tagen befanden sich fast ausschließlich Astrozyten (Monolayer) in den Kulturflaschen. Zum Abschluss wurde dieses Mangel-Medium wieder durch das anfängliche Vollmedium ersetzt und den Astrozyten zwei Tage Zeit gegeben, sich zu erholen, bevor eine Zellernte erfolgte oder sich weitere Stimulationsexperimente anschlossen.

2.2.3.5 EAE Experimente

Die EAE-Experimente wurden im Neurowissenschaftlichen Forschungshaus I der Charité in Kooperation mit der AG Aktas durchgeführt. 6-8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (Charles River) wurden subcutan mit 200 µl Immunisat pro Maus aktiv immunisiert. Das Immunisat enthielt zu gleichen Teilen PBS und CFA (Freund's complete adjuvant (Difco)). Zusätzlich enthielt es pro Maus

250 µg MOG-Peptid (MOG35-55: M E V G W Y R S P F S R V V H L Y R N G K) oder Ovalbumin (OVA) als Kontrolle und 800 µg H37RA (Mycobacterium tuberculosis (Difco)). Am Tag der Immunisierung und zwei Tage später wurde den Mäusen intraperitoneal 400 ng ptx (pertussis toxin (List Biological Laboratories)) verabreicht. Die Tiere wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten getötet:

1. früher Zeitpunkt: vor Auftreten der ersten Symptome bei MOG immunisierten Tieren (Tag 6 oder 8). Diese Gruppe wird im späteren mit „MOG früh“ bzw. „OVA früh“ bezeichnet.
2. später Zeitpunkt: nach dem Auftreten der ersten Symptome bei MOG immunisierten Tieren (14-27 Tage) der Stärke 1-2, d.h. mit partieller oder vollständiger Lähmung des Schwanzes bzw. leichter Lähmung der Hinterläufe.

Die Tiere wurden täglich begutachtet. Folgendes Werte-System (Scoring) zur Beurteilung des Krankheitszustandes wurde verwendet:

Symptom	Score
TPA oder RRW	0,5
TPA –TPL	0,75
TPL	1,0
TPL + HPA oder TPL + RRW	1,5
TPL + HPA + RRW	2,0
TPL + HPA + (FPA) + RRW oder TPL + HPA/HPL + RRW	2,5

TPA = partielle Schwanzlähmung

TPL= vollständige Schwanzlähmung

RRW = gestörter Dreh-Reflex; die Mäuse zeigen eine Störung, sich vom Rücken auf den Bauch zu drehen

HPA = partielle Lähmung der Hinterläufe

HPL = Lähmung der Hinterläufe

Bei den „Kontrollen“ handelt es sich um unbehandelte C57BL/6 Mäuse im Alter zwischen 10-12 Wochen.

2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

- Fixierlösung: 4% (w/v) Paraformaldehyd gelöst in PBS
- Blocklösung: 5% (v/v) Serum-Puffer (Ziege), 0,2% (v/v) Triton-X-100, 1% (w/v) BSA gelöst in PBS
- Quenching-Puffer: Methanol, 1,5% (v/v) H₂O₂
- Amplifizierungskit: TSA Kit 12 (Invitrogen)

Nach Induktion der EAE wurden die Mäuse am Tag 8 (MOG früh) bzw. bei einem Score von mindestens 1 (MOG spät) getötet. Das Gehirn wurde perfundiert, fixiert und für immunhistologische Zwecke verwendet. Zum gleichen Zeitpunkt wurde auch jeweils die gleiche Anzahl an OVA-Tieren getötet. Die unbehandelten Kontrollen besaßen das gleiche Alter wie die Versuchstiere.

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (72 mg/kg)/ Xylazine (4 mg/kg) narkotisiert. Zur Fixierung des Gehirns erfolgte eine Spülung des großen Kreislaufs mit eiskalten PBS. Die Mäuse wurden zunächst sternotomiert und der linke und rechte Vorhof des Herzens wurde mit einer Kanüle punktiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Mittels PBS wurde das Blut des großen Kreislaufs herausgespült. Narkotisierung und Perfusion wurden von Frau F. Schröter (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum Charité) durchgeführt, Nach Enthauptung wurde das Gehirn entnommen, halbiert und eine Hälfte in 4% Paraformaldehyd (PFA) für ein bis zwei Stunden fixiert. Die nachfolgende Verarbeitung bis zum Einbetten in Tissue-Tek wurden von Frau S. Balz (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum Charité) durchgeführt. Nach der Fixierung erfolgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS für jeweils dreißig Minuten auf Eis. Die Einlagerung des Gehirns in 30% Saccharose-Lösung (gelöst in PBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dieser Schritt dient dem Wasserentzug und somit der Verhinderung einer irreversiblen Zerstörung des Gewebes durch restliches Zell-Wasser. Das Gehirn wurde langsam in Tissue-Tek mit flüssigem Stickstoff tief gefroren. Die eingebetteten Gehirne wurden bei –80°C gelagert.

Die Gehirne wurden am Kryostat sagittal mit einer Schnittdicke von 10 µm geschnitten, auf Objektträgern (Marienfeld, 75x25x1mm, HistoBond®) gesammelt und bei –20°C gelagert. Für die Färbung wurden die Gewebsschnitte für eine Stunde luftgetrocknet und mit Dako Pen (Dako) umrandet. Danach erfolgte eine Fixierung mit 4% PFA für fünf Minuten. Für die Testung des verwendeten LMP7/β5i Antikörpers (Abcam ab3329) wurde in diesem Schritt Milz-Proteasom auf Gehirnschnitte fixiert. Nach kurzem Spülen mit PBS wurden die Schnitte für 20 min in eiskaltem Quenching-Puffer inkubiert und anschließend erneut mit PBS gespült. Danach wurden unspezifisch Bindungen für mindestens eine Stunde mit Blocklösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Der danach folgende Waschschrift erfolgte mit 0.1% Triton in PBS für fünf Minuten und wurde dreimal wiederholt. Die Inkubation des Sekundär-Antikörpers betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Für den Nachweis von GFAP wurde anti-Maus-Cy3 verwendet, für den Anti-Rattenmuskel Proteasom Antikörper ein anti-Rabbit-Alexa488. Die LMP7 Detektion erfolgte unter Zuhilfenahme des Amplifizierungskits TSA Kit #12 nach Angaben des Herstellers (Invitrogen). Die Zellkern-Färbung mittels Hoechst 33258 wurde mit dem zweiten Antikörper hinzugefügt. Die verwendeten Antikörper werden in 2.1.7 aufgelistet. Jeder Färbevorgang und Waschschrift wurde auf einem Schüttler vollzogen.

Die gefärbten Gehirnschnitte wurde mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (SPE System mit einem Mikroskop DM2500) analysiert. Die Präparate wurden bei einer 40- und 60-fachen Vergrößerung mikroskopisch untersucht und mit der LAS AF Software aufgezeichnet. Helligkeits- und Kontrasteinstellungen und die Überlagerungen der Aufnahmen wurden in Adobe Photoshop 6.0 durchgeführt.

2.2.5 Verwendete Software

Folgende Softwareprogramme oder Pakete wurden während der Doktorarbeit verwendet:

LAS AF (Leica), Adobe-Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated), Sigma-Stat 3.1 und Sigma-Plot (Systat Software), Microsoft Office Paket (Microsoft), EndNote 5 (ISI ResearchSoft) und die Vorhersageprogramme: PAProC [97] , MAPPP MHC-I binding prediction [98] und mhc-pathway.net [99]

3 Ergebnisse

3.1 Das 20S Proteasom in primären Astrozyten-Kulturen

Zu Beginn wurde ein Protokoll entwickelt und etabliert, das die Isolation und weitestgehende Reinkultivierung von Astrozyten aus dem Großhirn neugeborener C57BL/6 Mäuse erlaubt. Dazu wurden die entnommenen Großhirne (P0-P2) mit Hilfe von Filterpapier unter dem Mikroskop von ihren Hirnhäuten befreit. Das Gewebe wurde durch Pasteurpipetten mit abnehmendem Kapillardurchmesser pipettiert, so dass die so vereinzelt Zellen dann in Poly-Lysin beschichteten Zellkultur-Flaschen ausgesät werden konnten. Die Zellen wurden anfänglich unter nahrungsreichen Wachstumsbedingungen mit 10% FCS und 4,5g Glukose/L kultiviert. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, um die Konzentration der von den Astrozyten abgegebenen Wachstumsfaktoren niedrig zu halten. Nach zwei bis drei Tagen wurde die FCS-Menge auf 20% erhöht, dem Medium aber anstelle von Glucose 25mM Sorbitol hinzugefügt, um Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone zu eliminieren. Nach etwa 7 Tagen befanden sich fast ausschließlich Astrozyten (Monolayer) in den Kulturflaschen. Zum Abschluss wurde dieses Mangel-Medium wieder durch das anfängliche Vollmedium ersetzt und die Astrozyten 2 Tage weiter kultiviert, bevor eine Zellernte erfolgte oder sich weitere Stimulationsexperimente anschlossen.

Auf diese Weise konnten aus 40-50 Großhirnen neugeborener Mäuse $1,0-1,2 \times 10^8$ Astrozyten isoliert werden. Für eine Präparation von Proteasomen wurden mindestens 1×10^8 Zellen verwendet. Die Präparationsmethodik beinhaltete einen Glycerol-Gradienten und eine Anionenaustauscher-Chromatographie. Diese beiden Reinigungsschritte reichten jedoch nicht aus, um reines 20S Proteasom zu erhalten, wie in Abb. 4A zu sehen ist. Neben den charakteristischen Proteinbanden der 20S Proteasom Untereinheiten befinden sich noch weitere hochmolekulare Banden auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegele.

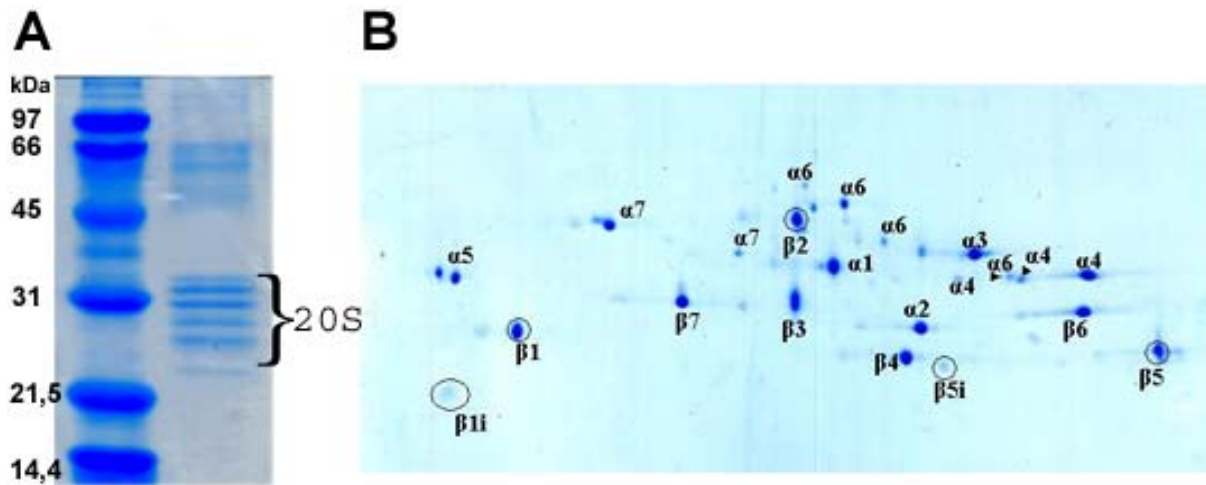


Abb. 4: 20S Proteasom isoliert aus primären Astrozyten. (A) 2 µg gereinigtes Proteasom wurde mittels 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Der Größenstandard ist in Kilodalton (kDa) angegeben. (B) 40µg isoliertes Proteasom wurde mittels 2D-PAGE aufgetrennt; gezeigt ist nur der Molekulargewichtsbereich in dem die Untereinheiten des 20S Proteasoms liegen (20-31 kDa). Die schwächeren Spots wurden teilweise mittels Massenspektrometrie identifiziert (nähere Angaben siehe Anhang). Dabei konnte β2i nicht gefunden werden. Die Hauptspots wurden über einen Vergleich mit anderen 2D-PAGEs bestimmt. Beide Gele wurden mittels Coomassie BB gefärbt.

Die so erzielte Ausbeute an angereichertem 20S Proteasom betrug 10-20µg. Bei einer kompletten Reinigung des Proteasoms wären die Verluste an Enzym zu hoch gewesen, um noch eine vergleichende Analyse zu ermöglichen. Die Untereinheiten-Zusammensetzung der gereinigten Proteasomen wurde mittels Westernblot (Abb. 5) und 2D-PAGE (Abb. 4B) analysiert. Die Proteasomen der primären Astrozyten zeigten eine relativ starke Expression von Immununtereinheiten (Abb. 5), so dass ein Unterschied zwischen stimulierten (INFγ) und unstimulierten Zellen nicht detektierbar war. Bei den im Westernblot detektierten Banden handelt es sich um die reifen (prozessierten) proteasomalen Untereinheiten, wie der Vergleich mit den Kontrollen (isoliertes 20S Proteasom aus Colon und Milz) und die Größe der Banden zeigt. Man kann folglich davon ausgehen, dass in den primären Astrozyten vollständige Immunproteasomen oder Intermediär-Typ Proteasomen vorliegen.

Auch auf der 2D-PAGE waren, wenn auch deutlich schwächer als im Westernblot, die Immununtereinheiten β1i und β5i zu erkennen (Abb. 4B). Die Untereinheit β2i konnte jedoch in der 2D-PAGE nicht identifiziert werden.

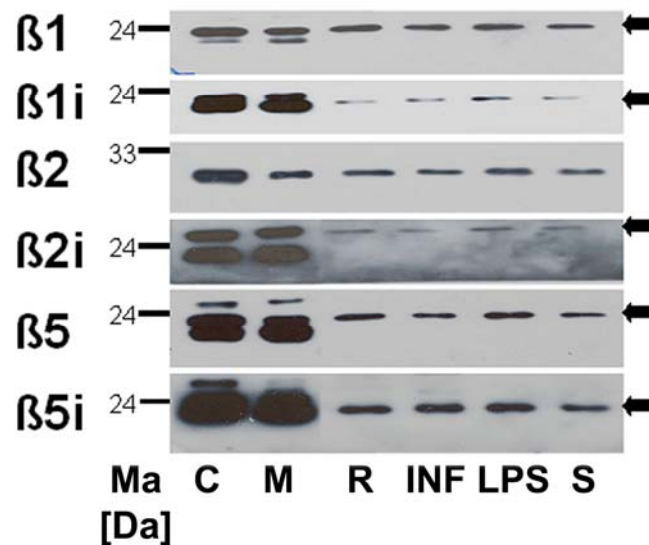


Abb. 5: Untereinheiten-Analyse der 20S Proteasomen aus primären Astrozyten. Aufgetragen wurden 500 ng isoliertes 20S Proteasom aus Colon (C) und Milz (M) sowie jeweils 20µg Lysatprotein aus unbehandelten Astrozyten (R), konfluenten ($\geq 100\%$ Konfluenz) und folglich gestressten Astrozyten (S) oder durch 100U/ml $\text{INF}\gamma$ für 4h (INF) bzw. 1 µg/ml LPS für 3h (LPS) stimulierten Astrozyten. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Immunoblot hinsichtlich ihres Gehalts an Immun- β -Untereinheiten sowie der analogen Standard- β -Untereinheiten analysiert. Bei Doppelbanden kennzeichnet der Pfeil die jeweils korrekte Bande. Zusätzliche Banden bei den Kontrollen (Colon und Milz) beruhen auf Mehrfachentwicklungen des gleichen Westernblots. Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

Dieser Befund steht den bislang in der Literatur publizierten Daten, dass Proteasomen aus dem adulten ZNS praktisch ausschließlich Standardproteasomen sind (siehe Einleitung 1.1.1), diametral entgegen. Da bei primärer Zellkultur nur sehr geringe Zellmengen für Untersuchungen zur Verfügung stehen, wurde für weitere Experimente auf die Astrozyten-Zelllinie TSA-3 von Dr. Gareth Pryce (Department of Neuroinflammation, Institute of Neurology, London, UK) zurückgegriffen.

3.2 Das 20S Proteasom in der Astrozyten-Zelllinie TSA-3

Aus Erfahrungen mit nicht-neuronalen Zelllinien, z.B. HeLa-Zellen, ist bereits bekannt, dass in Kultur gezogene Mammalia-Zellen auf fast jede Art von Stress unter anderem mit der Synthese von Immunproteasomen reagieren. Da die Isolationsprozedur und anschließende Kultivierung von primären Astrozyten aus neugeborenen Mäusen möglicherweise einen solchen Stressfaktor darstellt, der mit der Synthese von Immunproteasomen einhergeht, wurde die Maus-Astrozyten der Zelllinie TSA-3 möglichst stressfrei (Konfluenz $<80\%$, nur Wechsel

mit vorgewärmtem Medium) gezogen. Anhand dieser Zellkulturexperimente konnte demonstriert werden, das „in Ruhe“ gezogene Astrozytenzellen keine Immunproteasomen bzw. Immunproteasom-Untereinheiten enthalten (Abb. 6A). Sobald diese Zellen jedoch ohne diese Vorsichtsmaßnahmen gezogen oder in Anwesenheit von LPS bzw. IFN γ kultiviert wurden, generierten sie Immunproteasomen in ähnlichem Ausmaß, wie bei primären Astrozyten aus neugeborenen Mäusen beobachtet worden war (Abb. 6A). Demnach können Astrozyten auf Stress allgemein oder auf die Präsenz von bakteriellen Liganden für Toll-like Rezeptoren (LPS) bzw. durch die Anwesenheit von immun-stimulierenden Cytokinen (IFN γ) mit der Synthese von Immunproteasomen reagieren.

Wie bereits von Stohwasser et al. publiziert [100] reagiert die Mikroglia-Zelllinie BV2 (zur Verfügung gestellt von Dr. Orhan Aktas, Cecile-Vogt-Klinik für Molekulare Neurology, Charité-Universitätsmedizin Berlin) auf LPS- und IFN γ - Stimulation mit einer Induktion von Immunproteasom, wobei diese Zellen bereits im nicht stimulierten Zustand schon geringe Mengen an Immunproteasom besitzen. Deshalb wurde diese Zelllinie zur Kontrolle der Stimulations-Experimente mit Astrozyten verwendet (Abb. 6B).

Wie in Abbildung 6 erkennbar, reagierten sowohl die Astrozyten, als auch die Mikroglia mit Immunproteasom-Induktion, wobei es zu keinem vollständigen Austausch des Standardproteasoms gegen das Immunproteasom kommt. Auch im stimulierten Zustand ist noch eine deutliche Expression der Standardproteasom-Untereinheiten (β 1 und β 5) sichtbar.

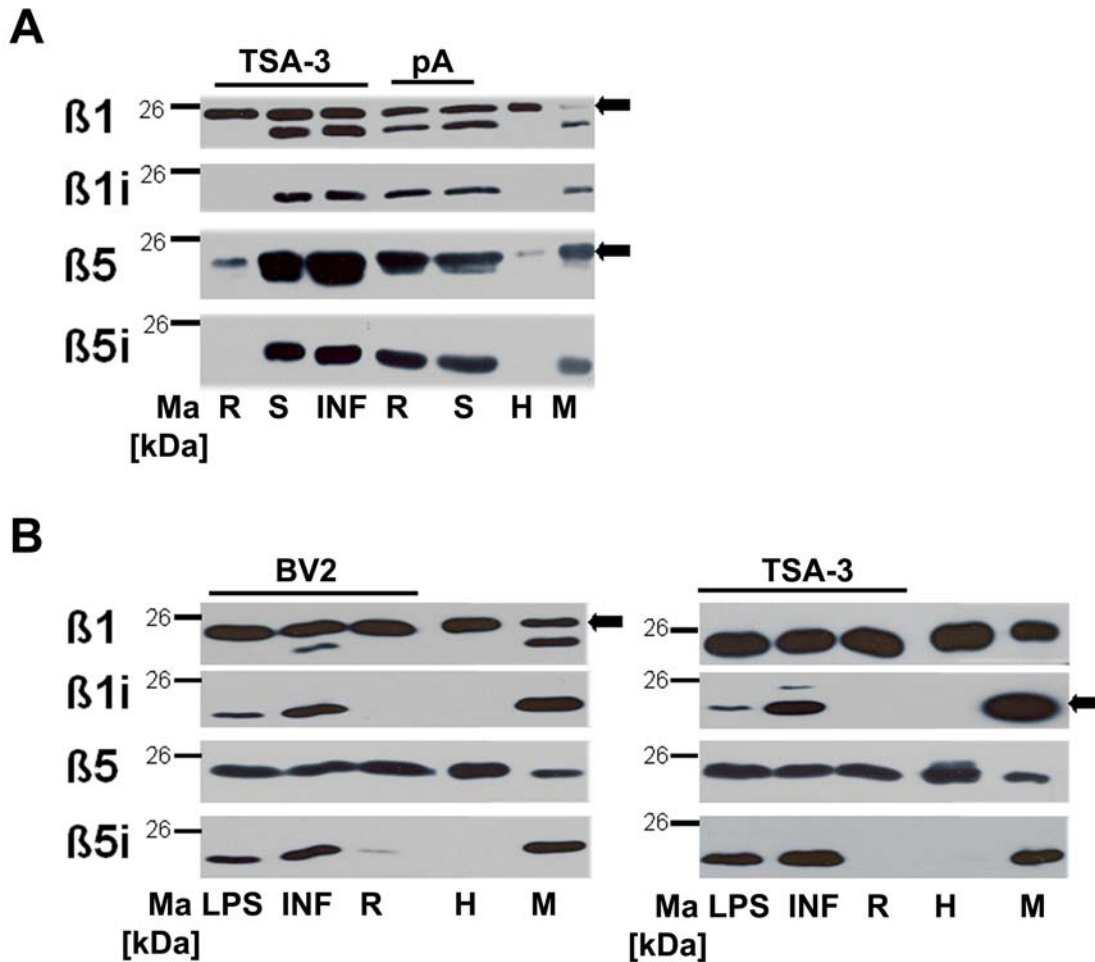


Abb. 6: Analyse der Expression von Proteasom- β -Untereinheiten in der Astrozyten-Zelllinie TSA-3 im Vergleich zu primären Astrozyten. (A) Westernblot der 20S Proteasomen isoliert aus der Zelllinie TSA-3 im Vergleich mit dem 20S Proteasom aus primären Astrozyten. TSA-3 Zellen und primäre Astrozyten wurden ‚in Ruhe‘ (R) gezogen oder mit erhöhter Konfluenz (>80%) (S). TSA-3 Zellen wurden zusätzlich 24h mit 100U/ml INF γ (INF) stimuliert. Aufgetragen wurden jeweils 500ng isoliertes Proteasom aus der Zelllinie TSA-3. Von dem aus primären Astrozyten angereichertem 20S Proteasom wurde je 1 μ g aufgetragen. (B) Stimulations-Experimente mit der Astrozyten-Zelllinie TSA-3 und der Mikroglia-Zelllinie BV2. Die Zellen wurden ‚in Ruhe‘ (R) gezogen oder mit 1 μ g/ml LPS (LPS) bzw. 100U/ml INF γ (INF) für 24h stimuliert. Aufgetragen jeweils 100 μ g Lysatprotein. Als Kontrollen dienten je 500ng 20S Proteasomen, die aus Herz und Milz der Maus isoliert wurden. Bei Doppelbanden kennzeichnet der Pfeil die jeweils korrekte Bande. Zusätzliche Banden beruhen auf Mehrfachentwicklungen des gleichen Westernblots. Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

In Folge der unterschiedlichen Ergebnisse aus den Experimenten mit primären Astrozyten und der Astrozyten-Zelllinie kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Astrozyten *in vivo* im Grundzustand Immunproteasom besitzen oder nicht. Die Tatsache, dass Proteasomen in primären Astrozyten die Immununtereinheiten besitzen, kann eine Besonderheit der Proteasomen im Neugeborenenhirn der Maus darstellen oder aber es handelt sich dabei um ein experimentelles Artefakt, dessen Ursache in dem Isolationsprozess der Zellen liegt. Um

diese Frage beantworten zu können, wurden 20S Proteasomen aus dem Großhirn von neugeborenen Mäusen isoliert und auf ihre Untereinheiten-Zusammensetzung überprüft.

Die isolierten Proteasomen wurden zusätzlich mit denen aus dem Großhirn von 12 Wochen (das entspricht in etwa dem Alter der Mäuse, die für EAE-Experimente verwendet wurden (siehe 3.4) und 8 Monate alten Tieren verglichen, um altersabhängige Veränderungen des Proteasoms zu finden, wie sie in der Literatur beschrieben werden. Nach bisher publizierten Daten kommt es zu einer Zunahme an Immununtereinheiten im Gehirn oder es bleibt die Menge an Immunproteasomen mit zunehmendem Alter gleich [18, 21, 22, 23, 24, 25, 101, 102, 103, 104] .

3.3 Das 20S Proteasom im Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen

Die Isolierung des 20S Proteasoms erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Toyopearl und MonoQ), Gelfiltration (Superose 6B) und hydrophober Interaktionschromatographie (Phenylsuperose). So gelang es, reine 20S Proteasomen in ausreichender Menge zu erhalten (Reinheitskontrolle siehe Abb. 8A), deren spezifische Aktivitäten mit Hilfe fluorogener Peptidsubstrate (SLLVY-AMC, BzVGR-AMC und ZLLE-AMC) bestimmt wurden. Anhand dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass sich die drei proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms mit zunehmendem Alter der Mäuse nicht signifikant ändern (Abb. 7).

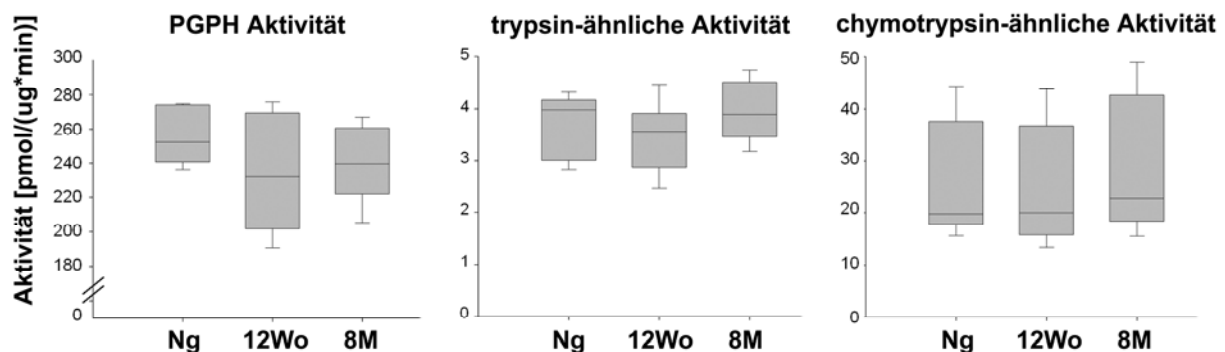


Abb. 7: Spezifische Aktivitäten der 20S Proteasomen aus dem Großhirn von neugeborenen (Ng), 12 Wochen (12Wo) und 8 Monate (8M) alten Mäusen. Die Werte errechnen sich aus zwei unabhängigen Präparationen pro Altersgruppe. Dabei wurden insgesamt 122 Neugeborene, 29 12 Wochen bzw. 30 8 Monate alte Tiere verwendet. Die schwarze Linie markierte den Median; die Abweichungen sind als 5te und 95ste Perzentile (Balken), sowie 25ste und 75ste Perzentile (Boxbegrenzung) angegeben.

Bei einem Vergleich der spezifischen Aktivitäten fällt auf, dass die PGPH-Aktivität den höchsten Substratumsatz besitzt und somit die dominierende Aktivität ist. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass es sich beim im Gehirn vorkommenden Proteasom hauptsächlich um ein Standardproteasom handelt [105]. Diese Hypothese wurde mittels Westernblot und 2D-PAGE überprüft. Weder im Westernblot (Abb. 8B) noch in der 2D-PAGE (Abb. 9) waren Immununtereinheiten nachweisbar. Zur Bestätigung der Identität einzelner Protein-Spots des 2D-Gels wurden diese ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert (nähere Angabe siehe Anhang ab S. 111). Im Westernblot zeigte ein Vergleich mit den zur Kontrolle aufgetragenen 20S Proteasomen aus Colon und Milz, das lediglich die Standarduntereinheiten im Proteasom isoliert aus Großhirn von Mäusen nachweisbar sind. Die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ waren nur in isolierten Proteasomen der Kontrollen aus Colon und Milz detektierbar. Doppelbanden bei den Kontrollen resultieren aus der Mehrfachentwicklung eines Westernblots.

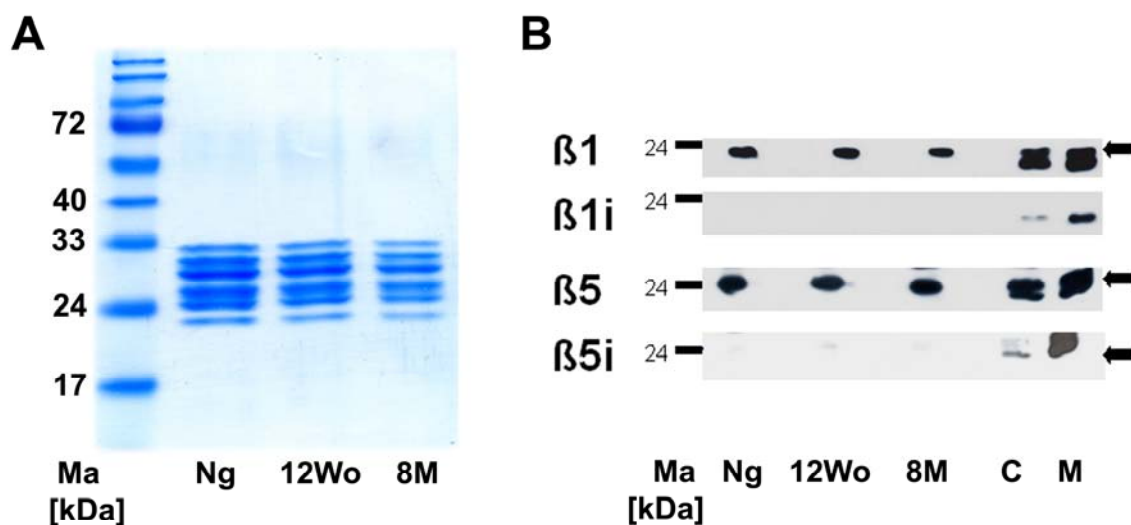


Abb. 8: 20S Proteasom isoliert aus dem Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen. (A) Reinheitskontrolle der isolierten 20S Proteasomen mittels SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) Aufgetragen wurden jeweils 3 μ g Proteasom aus neugeborenen (Ng), 12 Wochen alten (12Wo) sowie 8 Monate alten (8M) Mäusen. (B) Westernblot der 20S Proteasomen isoliert aus dem Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen; Als Kontrollen dienten 20S Proteasomen (500ng) isoliert aus Colon (C) und Milz (M). Schwarze Pfeile markieren die korrekte Bande. Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

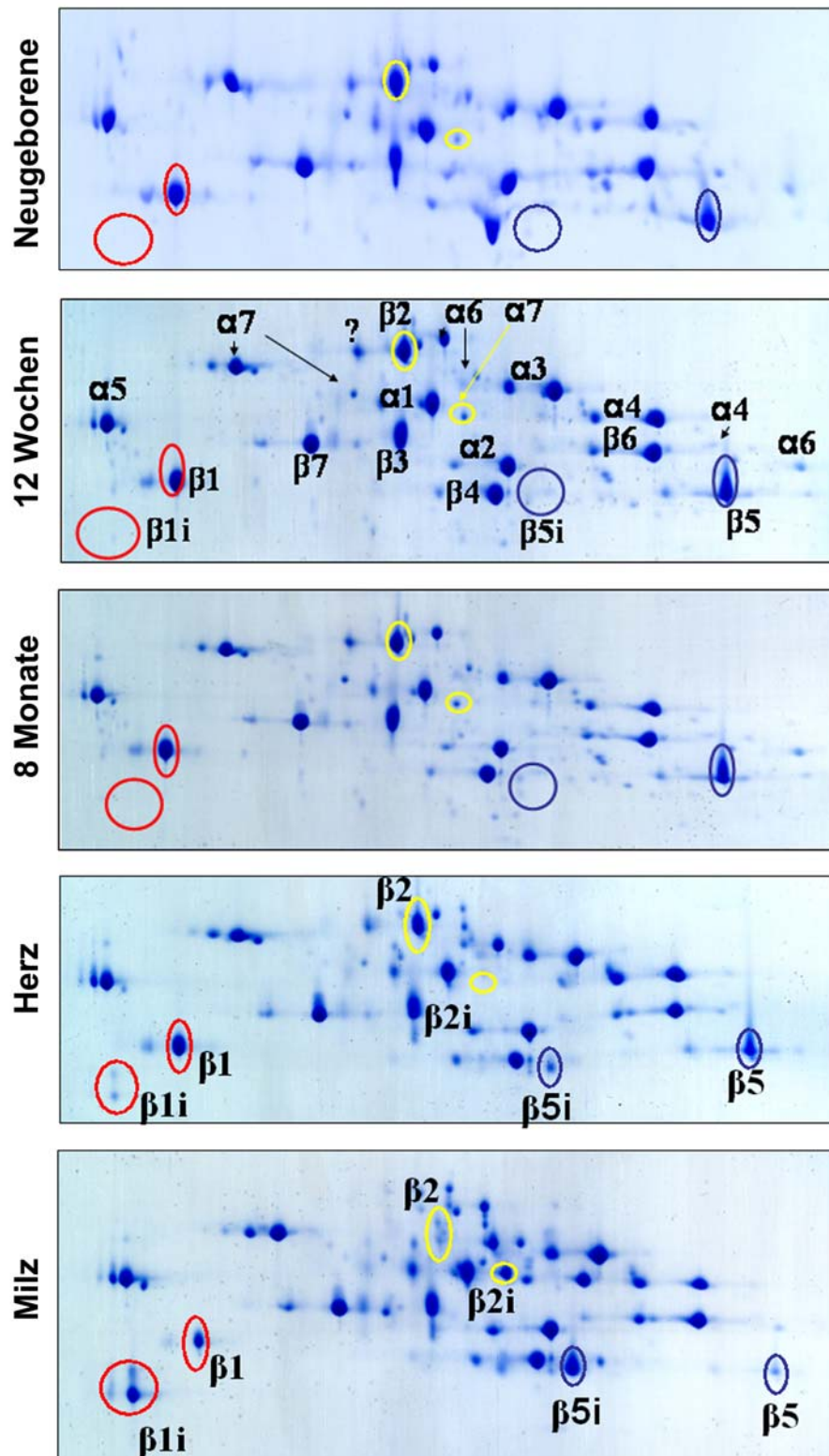


Abb. 9: 2D-PAGE von 20S Proteasomen isoliert aus dem Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen. Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Proteasom und die 2D-Gele Coomassie gefärbt. Die katalytischen Untereinheiten bzw. der Bereich in denen sie sich befinden würden sind mit farblichen Kreisen markiert β1/βi (rot), β2/β2i (gelb) und β5/β5i (blau). In den Großhirn-Proteasomen konnten keine Immununtereinheiten identifiziert werden. Der Spot an der Position von β2i ist in den Hirnen als α7 identifiziert worden. Exemplarisch ist ein 2D-Gel mit den identifizierten Spots beschriftet. Als Vergleich abgebildet sind die 2D Muster des 20S Proteasoms isoliert aus Herz und Milz der Maus. Dargestellt ist jeweils nur der Größenbereich der 20S Untereinheiten (20-31 kDa).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Proteasomen im Großhirn von Mäusen der hier untersuchten Alterstufen ausschließlich Standardproteasom sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bislang publizierten Daten (siehe Einleitung Proteasom im ZNS) und den Befunden aus *in vitro* Experimenten mit der Astrozyten-Zelllinie TSA-3, aber im Gegensatz zu den Befunden, die mit primären Astrozyten erhoben wurden. Die Daten aus primären Zellen scheinen somit nicht die *in vivo* Situation widerzuspiegeln. Außerdem wird keine alterabhängige Zunahme bzw. Expression von Immununtereinheiten im Großhirn von gesunden Mäusen beobachtet, wie es in der Literatur beschrieben wird.

3.4 Maus EAE Experimente

Die Experimente mit Astrozyten zeigten eindeutig, dass diese in der Lage sind Immunproteasom zu produzieren. Auf Grund dieser Ergebnisse ist nicht auszuschließen, dass bei mit inflammatorischen Prozessen einhergehenden Krankheiten des ZNS Astrozyten ebenfalls mit der Bildung von Immunproteasomen reagieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden *in vivo* Experimente mit Mäusen durchgeführt, bei denen eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ausgelöst wurde.

Zur Untersuchung der Veränderung des Proteasoms bei Entzündungsprozessen im ZNS wurden weibliche Mäuse (C57BL/6) aktiv mit murinem MOG35-55 (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) immunisiert. Als Kontrollen wurden unbehandelte und mit OVA immunisierte Tiere verwendet. Bei der resultierenden EAE wurden zwei Krankheitsstadien unterschieden: ein früher Zeitpunkt der Erkrankung ohne sichtbare Symptome, welcher in den Abbildungen mit dem Zusatz „früh“ für die MOG und OVA Immunisierung bezeichnet wird und ein später Zeitpunkt, bei dem bereits neurologische Störungen auftraten. Letzterer wird in den Abbildungen mit dem Zusatz „später“ für OVA bzw. MOG bezeichnet. Als neurologische Störungen traten vor allem Stand- und / oder Gangataxie, Schwanzlähmung, Parese bis zur zur Plegie der Hinterbeine auf.

Da es methodisch nicht möglich war, aus dem Großhirn von 10-12 Wochen alten Mäusen (wie sie für die EAE-Experimente verwendet wurden) Astrozyten zu isolieren, um deren Proteasomen-Zusammensetzung zu untersuchen, wurden hierfür Gesamtextrakte des Großhirns verwendet. Dabei erfolgte die Isolierung des Proteasoms wie unter 3.3 bereits beschrieben wurde.

3.4.1 Untersuchungen zur transkriptionellen Expression (mRNA) von Immunproteasom-Untereinheiten im Großhirn von Mäusen nach Induktion einer EAE

Mit Hilfe von RNA-Arrays (*Affimetrix Mouse whole genome 430 2.0 plus*) wurde untersucht, ob Veränderungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems der erkrankten Mäuse auf dem Level der mRNA stattfinden. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus dem Großhirn von je 5 Tieren pro Gruppe (unbehandelte Kontrollen, OVA früh, OVA spät, MOG früh, MOG spät) isoliert und je 2µg RNA von jedem Tier einer Gruppe zu einer Probe vereint. Jede dieser Proben wurde auf einem einzelnen Affimetrix-Chip hybridisiert, die anschließend miteinander verglichen wurden. Die Hybridisierungen wurden von der Firma Signature Diagnostics AG durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es, Veränderungen im Proteasom-System zu detektieren. Deshalb wird im Folgenden nicht auf alle Gene des Affimetrix-Chips eingegangen, sondern lediglich auf das Proteasom und seine Regulatoren sowie ausgewählte Proteine. Ausführliche Tabellen, die alle relevanten Daten zusammenfassen, befinden sich im Anhang ab S. 117.

Folgende Voraussetzungen wurden als Auswertungskriterien definiert: (i) Das Transkript muss mindestens in einer der 5 untersuchten Tiergruppen präsent sein. (ii) Die gemessenen Absolutwerte müssen mindestens 10 betragen, ansonsten liegt das Signal im Bereich des Hintergrundrauschens. (iii) Als induziert oder reprimiert gilt ein Gen, das sich mindestens um den Faktor zwei verändert.

Legt man diese Kriterien zu Grunde, so waren alle 20S Untereinheiten in allen Tiergruppen exprimiert. Auf RNA-Ebene war eine Induktion der Immunproteasom-Untereinheiten $\beta 1i$ (*Psmb9*) und $\beta 5i$ (*Psmb8*) in den bereits erkrankten MOG Tieren messbar (Tab. 4). Es erfolgte ein 5-6-fache Induktion in der Gruppe der späten MOG Tiere, die allerdings von ihrer Signalstärke immer noch deutlich unterhalb der Expressionsstärke der konstitutiven Untereinheiten lag. In den erkrankten Tieren waren $\beta 1i$ um das ca. 32-fache und $\beta 5i$ um das ca. 15-fach niedriger in der Signalstärke als die korrespondierenden Standardproteasom-Untereinheiten. Die RNA von $\beta 2i$ (*MECL-1*) war in allen Tieren deutlich stärker detektierbar als die RNA der anderen Immununtereinheiten. Die Expressionsstärke veränderte sich im Laufe der Erkrankung nicht. Letzteres gilt auch für alle weiteren 20S Untereinheiten (Anhang Tab. 7 und 8). $\beta 2i$ war nur etwa 7-mal weniger stark exprimiert als ihr Counterpart $\beta 1$.

Tab. 4: Array- Signalstärken der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

Protein	Genname	Kontrolle	OVA früh	OVA spät	MOG früh	MOG spät
beta 1	Psmb6	4510	4501	4773	4375	4501
beta 2	Psmb7	7078	6410	5923	6031	6724
beta 5	Psmb5	3979	4129	4573	4294	4129
beta 1i	Psmb9	19	20	23	23	139
beta 2i	Psmb10	936	871	1008	969	997
beta 5i	Psmb8	49	46	56	62	273

Dass ein Inflammationssignal wie $\text{INF}\gamma$ deutlich stärkere Signale der Immununtereinheiten induzieren kann als in hiesigen Experimenten gefunden, zeigen die Array-Experimente von Dr. Ulrike Kuckelkorn, die mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt wurden. Dazu wurde RNA, isoliert aus unbehandelten oder $\text{INF}\gamma$ stimulierten (50U/ml, 24h) Mausfibroblasten der Zelllinie B8, auf Affimetrix-Chips hybridisiert. Die gemessenen Signalintensitäten sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Man erkennt deutlich, dass bereits in unstimulierten Zellen ein stärkeres Signal für die Immununtereinheiten vorhanden ist, als im EAE-Experiment in den MOG Tieren zum späten Zeitpunkt gefunden wurde. Infolgedessen ist die Signalintensität in den stimulierten Zellen deutlich höher als im EAE-Experiment. Im Gegensatz dazu sind die Expressionswerte der Standarduntereinheiten nicht so stark abweichend beim Vergleich der Experimente. Für $\beta 1$ sind sie in beiden Experimenten (Mausfibroblasten und EAE-Experiment) fast identisch. Bei $\beta 2$ sind die Signalwerte im Fibroblasten-Experiment etwa doppelt so hoch wie im EAE-Experiment, für $\beta 5$ dafür nur halb so groß.

Tab. 5: Array- Signalstärken der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms aus Stimulationsexperimenten. Mausfibroblasten-Zellen (B8) wurden 24h mit 50 U/ml $\text{INF}\gamma$ stimuliert oder blieben unbehandelt. (U. Kuckelkorn, unveröffentlichte Daten)

Protein	Genname	Kontrolle	50U/ml $\text{INF}\gamma$ 24h
beta 1	Psmb6	3749	3978,6
beta 2	Psmb7	11463,4	11561,3
beta 5	Psmb5	2398,7	2440,5
beta 1i	Psmb9	219,4	2359,4
beta 2i	Psmb10	992,8	4527,4
beta 5i	Psmb8	505	3671,4

Die höchst unterschiedlichen mRNA Signalstärken der Immununtereinheiten im Vergleich zu den Standarduntereinheiten im EAE-Experiment lassen die Vermutung zu, dass kaum Immununtereinheiten im Großhirn vorhanden sind, bzw. aufgrund der deutlich höheren Expression der Standarduntereinheiten vor allem dieser Proteasom-Typ im Großhirn vorhanden ist. Der Vergleich der Signalstärken des EAE-Experimentes mit denen des Zellexperimentes von Dr. Kuckelkorn bestärkt diese Vermutung, da gezeigt werden konnte, dass prinzipiell eine höhere Signalstärke der Immunproteasom-Untereinheiten nach Induktion gefunden wird.

Die hohen Expressionswerte der Untereinheit $\beta 2i$ legen den Schluss nahe, dass ein Vorkommen von Proteasomen mit eingebautem $\beta 2i$ theoretisch möglich ist. Nach Groettrup et al. [106] ist der Einbau von $\beta 2i$ jedoch abhängig von der gleichzeitigen Inkorporation von $\beta 1i$. Deshalb ist es weniger wahrscheinlich im ZNS $\beta 2i$ enthaltende Proteasomen zu finden.

Für die Immununtereinheiten wurde das Array-Ergebnis mittels Real-time PCR überprüft. Dabei zeichnete sich ein ähnliches Bild ab, wie schon in den Array Ergebnissen, wobei allerdings die Induktion der Immunproteasom-Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ nicht so deutlich ausfiel und bereits in den prospektiv erkrankten Mäusen („MOG früh“) erfolgte. Es wurde eine 2-3- fache Induktion von $\beta 1i$ und $\beta 5i$ beobachtet. $\beta 2i$ blieb weitestgehend unverändert (Abb. 10). Vergleicht man hier die Expressionsstärken zwischen den Immununtereinheiten (Abb. 10 unten), so fällt auf, dass die Expression von $\beta 1i$ und $\beta 5i$ deutlich niedriger ist, als die von $\beta 2i$. Die gleiche Beobachtung wurde auch in den Array-Experimenten gemacht. Auch bei diesem Versuch waren die Signalstärken für $\beta 2i$ deutlich höher als für die anderen beiden Immununtereinheiten (Tab. 4) Die niedrigen Werte weisen erneut auf eine sehr geringe Expressionsstärke der Immununtereinheiten hin.

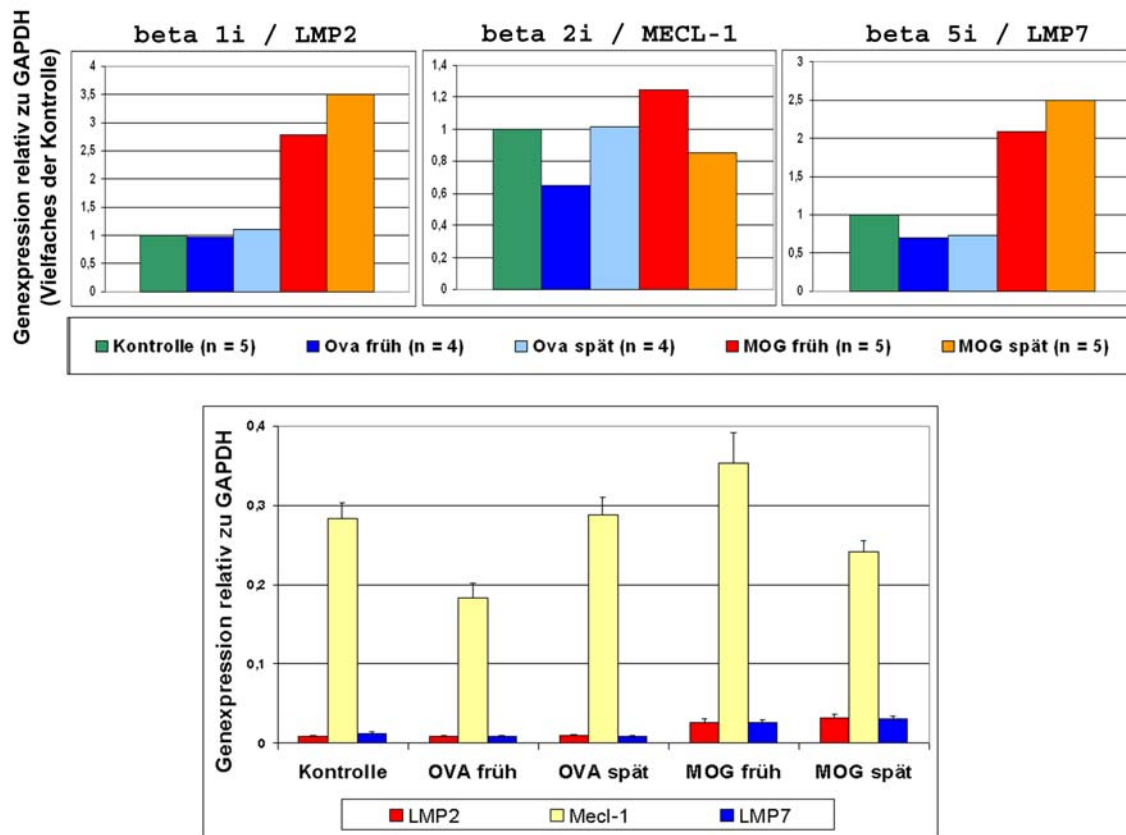


Abb. 10: Genexpression der Proteasom-Untereinheiten. Die Genexpression wurde mittels Real-Time PCR relativ zu GAPDH gemessen und in den oberen drei Graphiken auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die PCR wurde bei 4 bis 5 Tieren separat durchgeführt und anschließend wurden die Werte gemittelt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Auch die 19S Regulator Untereinheiten sowie PA28 sind in den Array-Experimenten detektierbar und verändern ihre Expressionsstärke nicht (Anhang Tab. 9 und 10). Dies gilt auch für die meisten an der Ubiquitinierungs-Kaskade beteiligten Enzyme und den Maturierungsfaktor POMP (Anhang Tab. 12).

Interessanterweise sind die klassischen Inflammationssignale wie Interleukin-1 bzw. -6 und TNF unter diesen Umständen der MOG-induzierten EAE nicht detektierbar. Auf der anderen Seite ist aber die mRNA einiger TNF (Tumor Nekrose Faktor)-Rezeptoren, der Rezeptoren für Interferon α und γ sowie anderer Interleukine und deren Rezeptoren vorhanden (Anhang Tab. 12-14, 16 und 17). Die Interferone selbst sind nicht exprimiert. Von den Toll-like-Rezeptoren ist mRNA für TLR-2, -3 und -13 exprimiert, die Expression von TLR-1 und -7 ist nur marginal (Anhang Tab. 15). Es sind zudem verschiedene Chemokine und deren Rezeptoren exprimiert bzw. induziert. Ebenfalls induziert ist das intrazelluläre

Adhäsionsmolekül ICAM1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1), welches für die Rekrutierung von Blutzellen ins ZNS mit verantwortlich ist. Zusätzlich von Interesse ist die Induktion der Expression von GFAP (Glial fibrillary acidic protein, oder „Saures Gliafaserprotein“) in den MOG immunisierten Tieren, sowie die Induktion von S100, was auf eine Aktivierung von Astrozyten schließen lässt.

Insgesamt lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass trotz deutlicher Hinweise auf eine Inflammation im Großhirn, bei der es zu einer Aktivierung von Astrozyten kommt (GFAP Induktion), praktisch kaum Immunproteasomen-Untereinheiten gebildet werden (nur sehr geringe Signalstärken bzw. Expressionswerte). Somit ist zu erwarten, dass (wenn überhaupt) nur sehr wenige Zellen im Gehirn Immunproteasomen enthalten.

3.4.2 Immunhistologischer Nachweis von Immunproteasomen in Gehirnen EAE erkrankter Mäuse

Es stellte sich nun die Frage, ob sich die RNA-Daten auch auf Proteinebene widerspiegeln. In einem ersten Versuch wurden deshalb sagittale Gewebeschnitte aus dem Gehirn EAE erkrankter Mäuse mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Immunproteasom-Induktion überprüft. Dabei wurden Antikörper gegen die Untereinheit $\beta 5i$ (LMP7) für das Immunproteasom und gegen GFAP als Astrozytenmarker für aktivierte Astrozyten verwendet.

Zur Überprüfung der Funktionalität des $\beta 5i$ (LMP7) Antikörpers wurde gereinigtes Milz-Proteasom auf Hirnschnitte von Kontrolltieren fixiert und anschließend mit dem Antikörper detektiert (Abb. 11 A-C). Unter diesen Bedingungen ist ein deutliches Signal großflächig auf den Gewebeschnitten erkennbar. In den Abbildungen 11 D-F sind unbehandelte Schnitte, ebenfalls mit dem $\beta 5i$ Antikörper inkubiert, gezeigt, bei denen kein Signal für $\beta 5i$ sichtbar ist. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass der Antikörper Immunproteasomen (Milzproteasomen) in der Immunhistochemie erkennen kann, jedoch im Hirn unbehandelter Mäuse scheinbar kein Immunproteasom exprimiert wird (Abb. 11 D-F).

Weiterhin wurde durch eine Färbung mit einem polyklonalen anti-Proteasomen-Antikörper (AK 37) gezeigt, dass prinzipiell Proteasomen in den Zellen des Gehirns vorhanden und immunhistochemisch nachweisbar sind (Abb. 11 G-I).

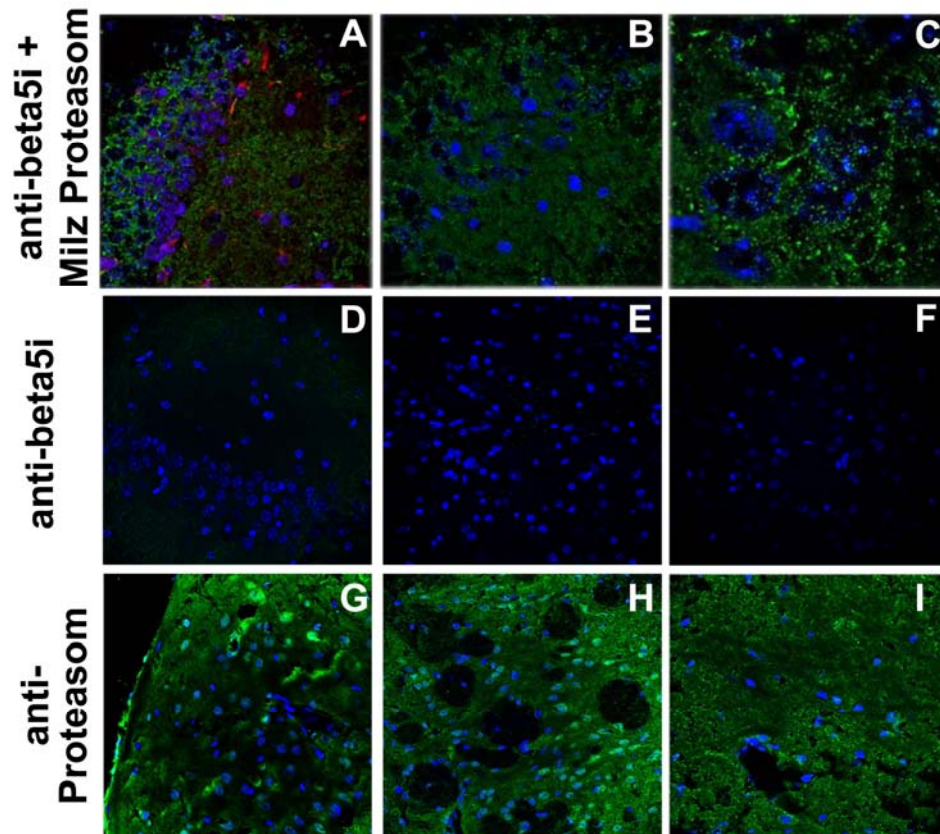


Abb. 11: Antikörper-Test und Proteasom-Nachweis auf Gewebeschnitten von Hirnen unbehandelter Mäuse (Kontrolle), Abb. A-F: Nachweis von $\beta 5i$ (Immunproteasom-Marker) mit Alexa488 (grün) und GFAP (Astrozyten-Marker) mit Alexa568 (rot). Die Überlagerung der beiden Färbungen bei Kolokalisation würde ein gelbes Signal ergeben. Zellkerne wurden mittels Hoechst-Farbstoff 33342 sichtbar gemacht (blau). In den Abb. A-C wurde Milz-Proteasom auf die Hirnschnitte fixiert. D-F zeigen unbehandelte Hirnschnitte. Abb. G -I: Nachweis von Proteasomen durch den anti-Proteasom Antikörper 37 mit Alexa488 (grün) auf unbehandelten Hirnschnitten. Die Aufnahmen wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung an einem DM2500 Mikroskop (Leica, SPE System) mit der LAS AF Software aufgezeichnet.

In weiten Teilen des cerebralen Cortex bzw. des Großhirns wurden kaum bzw. keine Signale von Immunproteasomen ($\beta 5i$) oder Astrozyten (GFAP) gefunden (Abb. 12 A, E, I, M, Q). Diese Beobachtung galt unabhängig vom Erkrankungszustand der Tiere.

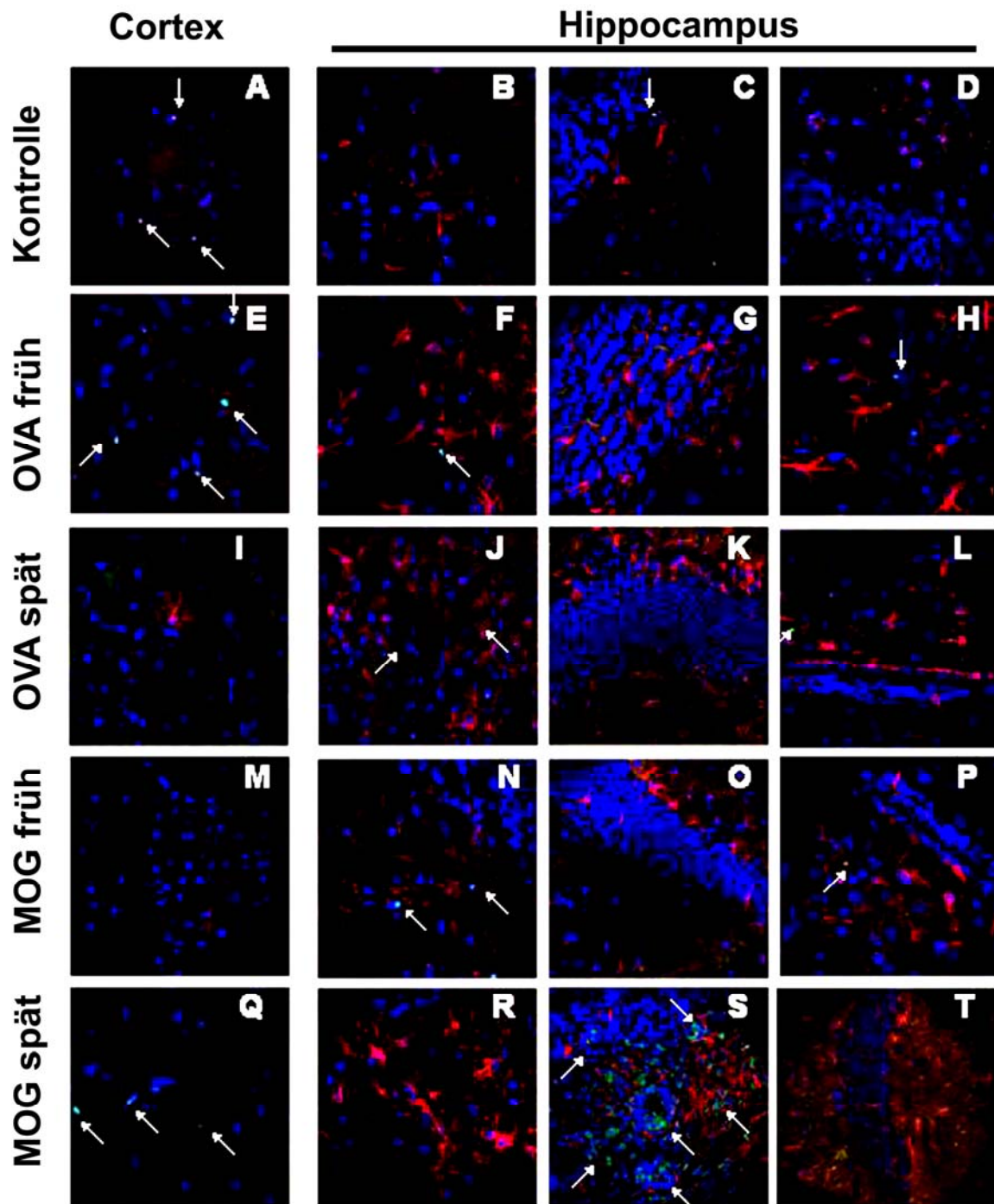


Abb. 12: Immunfluoreszenzmikroskopie vom cerebralen Cortex und der Hippocampusregion von unbehandelten Mäusen (Kontrolle), mit Ovalbumin behandelten Mäusen (OVA früh und OVA spät); sowie MOG35-55 behandelte Tiere (MOG früh und MOG spät). Nachweis von β5i (Immunproteasom-Marker) mit Alexa488 (grün) und GFAP (Astrozyten-Marker) mit Alexa568 (rot). Zellkerne wurden mittels Hoechst-Farbstoff 33342 sichtbar gemacht (blau). Weiße Pfeile markieren β5i positive Zellen. Eine Überlagerung / Kolokalisation von β5i und GFAP wäre als gelbes Signal sichtbar. Die Aufnahmen wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung an einem DM2500 Mikroskop (Leica, SPE System) mit der LAS AF Software aufgezeichnet.

Im Gegensatz dazu findet man in der Hippocampus-Region eine deutliche Astrozyten-Aktivierung nach Immunisierung (Abb. 11). Das galt sowohl für die mit OVA als auch für die mittels MOG immunisierten Tiere. In den erkrankten Tieren wurden stellenweise in kapillarnähe Signale von Immunproteasomen gefunden, jedoch keine Kollokalisierung mit dem Astrozytenmarker GFAP (Abb. 11 S).

Im Cerebellum hingegen ließen sich Signale vom Immunproteasom detektieren (Abb. 13). Diese befanden sich überwiegend in der Molekularschicht des Kleinhirns und dort in den Bereichen der Gyri (Abb. 13 B, F, I, P, R). Das faserförmige Erscheinungsbild deutet auf eine Lokalisation in Zellausläufern hin, wobei eine nähere Charakterisierung und Identifizierung der Zellen bisher noch nicht möglich war. In den unbehandelten Kontrollen fanden sich vereinzelt Signale von reaktiven Astrozyten an der Hirnhaut (Abb. 13 B) bzw. in der Körnerschicht (Abb. 13 A, B, D). Sie waren jedoch nicht mit Signalen für das Immunproteasom kollokaliert. Nach Immunisierung war im Mark und in der Rinde des Cerebellums eine deutliche Zunahme an GFAP positiven Zellen zu verzeichnen (Abb. 13 E-S), besonders im Bereich der Gyri und der Hirnhäute. Im Bereich der Sulci waren kaum Signale zu detektieren. Während bei den OVA immunisierten Tieren die Signale von GFAP und $\beta 5i$ nicht kollokalierten (Abb. 13 F, H, I), schien es teilweise bei den MOG Tieren zu einer Expression von Immunproteasom in GFAP positiven Astrozyten zu kommen (Abb. 13 M und R). In den OVA und MOG Tieren beobachtet man eine Abnahme an $\beta 5i$ positiven dendritischen Strukturen bei gleichzeitiger Zunahme an GFAP positiven dendritischen Strukturen (Abb. 13 vergleiche E und F mit H und I, vergleiche L-N mit P-R). In den MOG Tieren sah man eine Zunahme an GFAP Signalen, wobei diese dann teilweise Kollokalisierungen mit $\beta 5i$ zeigten (Abb. 13 M und R). Im Mark des Kleinhirns erschienen nach Immunisierung vereinzelt $\beta 5i$ positive Zellen (Abb. 13 G, K, O, S). Diese befanden sich häufig in der Nähe oder am Rand von Blutgefäßen. Insgesamt ließen sich aber nur sehr wenige Immunproteasomen enthaltende Zellen im Mark finden.

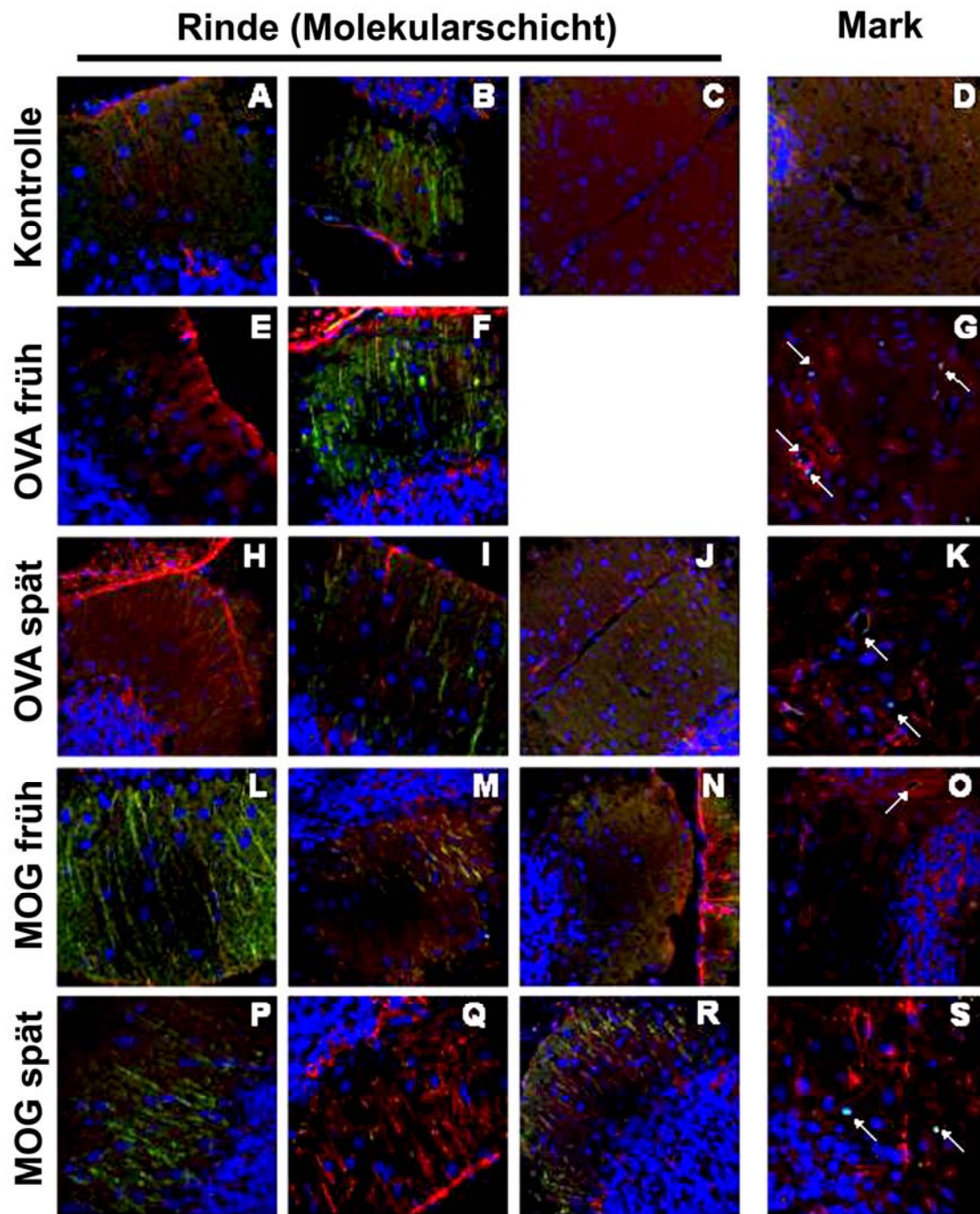


Abb. 13: Immunfluoreszenz vom Cerebellum von unbehandelten Mäusen (Kontrolle), mit Ovalbumin behandelten Mäusen (OVA früh und OVA spät); sowie MOG35-55 behandelte Tiere (MOG früh und MOG spät). Nachweis von $\beta 5i$ (Immunproteasom-Marker) mit Alexa488 (grün) und GFAP (Astrozyten-Marker) mit Alexa568 (rot). Zellkerne wurden mittels Hoechst-Farbstoff 33342 sichtbar gemacht (blau). Im Mark des Kleinhirns sind $\beta 5i$ positive Zellen durch weiße Pfeile markiert. Eine Überlagerung / Kolokalisation von $\beta 5i$ und GFAP ist gelb dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung an einem DM2500 Mikroskop (Leica, SPE System) mit der LAS AF Software aufgezeichnet.

Betrachtet man die Ventrikel bzw. ihre nähere Umgebung (Abb. 14), so sah man in den unbehandelten Kontrollen keine Signale für $\beta 5i$ oder GFAP (Abb. 14 A). Nach der Immunisierung erfolgte in der OVA und der MOG Gruppe eine deutliche Zunahme an GFAP positiven Astrozyten (Abb. 14 B-K), d.h. sie wurden aktiviert. Auch erschienen im oder am Rand der Ventrikel zum frühen Zeitpunkt erste Immunproteasom-positive Zellen, die jedoch GFAP negativ waren (Abb. 14 B, C, G, H). Bei den OVA immunisierten Tieren blieben diese $\beta 5i$ positiven Zellen vor allem in den Ventrikeln bzw. dem Plexus choroideus (Abb. 14 D-F). Im Gegensatz dazu beobachtet man eine massive Invasion dieser Zellen bei den erkrankten MOG Tieren (Abb. 14 I-K). Dabei kam es stellenweise zu einer Kolo-kalisation von $\beta 5i$ und GFAP, wobei nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass dies ausschließlich aufgrund der massiven Signalstärke/Zelldichte der Fall war.

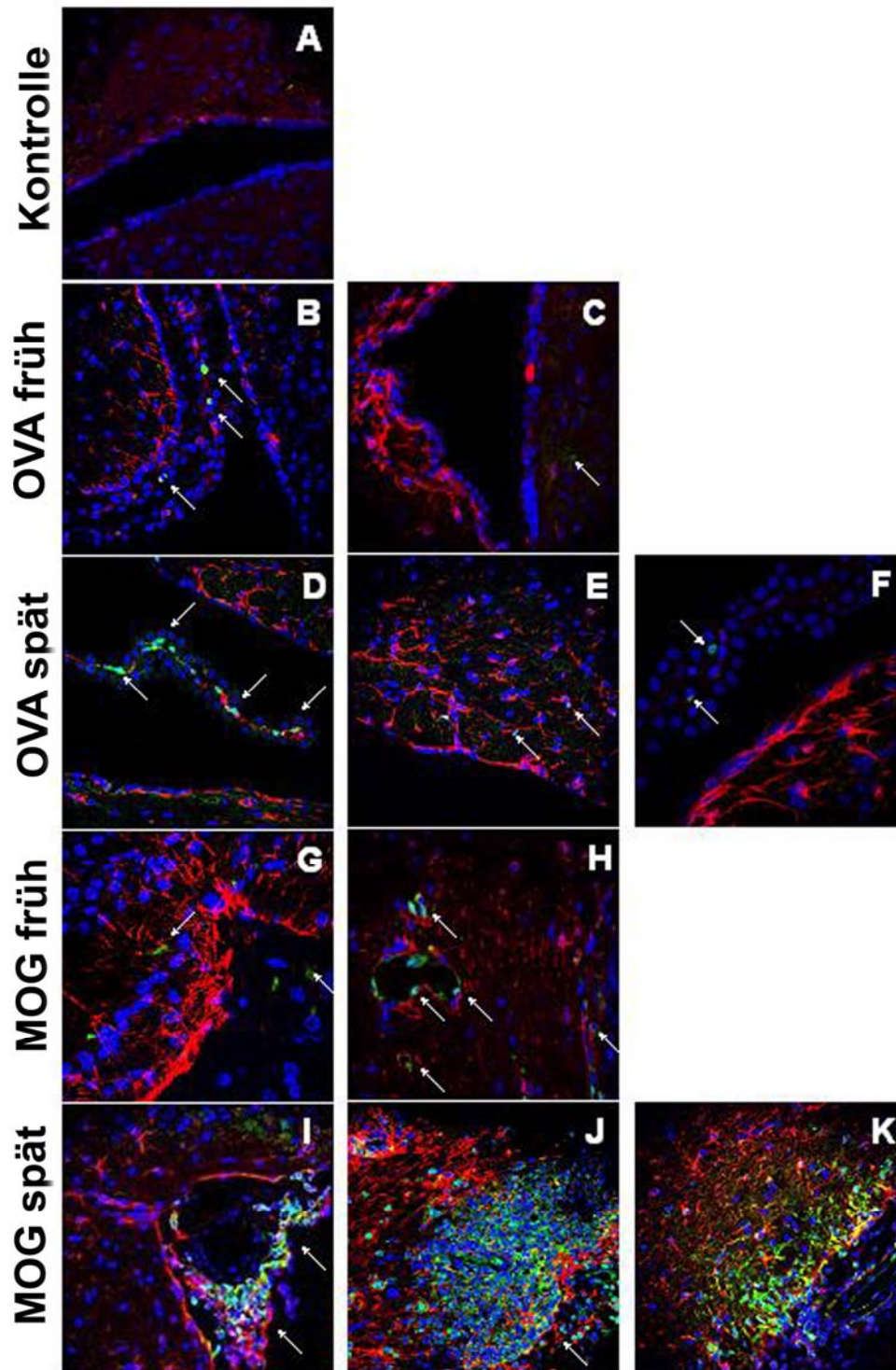


Abb. 14: Immunfluoreszenz von den Ventrikeln von unbehandelten Mäusen (Kontrolle), mit Ovalbumin behandelten Mäusen (OVA früh und OVA spät); sowie MOG35-55 behandelte Tiere (MOG früh und MOG spät) Nachweis von β 5i (Immunproteasom-Marker) mit Alexa488 (grün) und GFAP (Astrozyten-Marker) mit Alexa568 (rot). Die Überlagerung der beiden Färbungen bei Kolokalisation ist gelb dargestellt. Zellkerne wurden mittels Hoechst-Farbstoff 33342 sichtbar gemacht (blau). Weiße Pfeile markieren β 5i positive Zellen. Die Aufnahmen wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung an einem DM2500 Mikroskop (Leica, SPE System) mit der LAS AF Software aufgezeichnet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch die Immunisierung allein zu einer länger anhaltenden Astrozyten-Aktivierung im Gehirn kam. Signale der Proteasom-Untereinheit $\beta 5i$ erschienen vor allem an den Gyri des Kleinhirns und an bzw. in den Ventrikeln der mit OVA als auch der mit MOG injizierten Tiere. In der OVA Gruppe verblieben die $\beta 5i$ positiven Zellen in der Regel in den Ventrikeln, wohingegen bei den erkrankten MOG Tieren die Signale des $\beta 5i$ -Antikörpers im Hirnparenchym zu finden waren. Es ließen sich aber kaum $\beta 5i$ positive Astrozyten finden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Daten aus primären Astrozyten, jedoch im Einklang mit den *in vitro* Daten der Zelllinie TSA-3. Außerdem stimmen die Ergebnisse aus der Immunhistologie sehr gut mit den RNA-Daten überein, wo nur geringe Signalstärken für die Immununtereinheiten gefunden wurden.

3.4.3 20S Proteasom im Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen - Vergleich ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung

Alle bislang dargestellten Ergebnisse der molekularbiologischen und immunhistologischen Untersuchungen zur Induktion des Immunproteasoms im ZNS nach Induktion von EAE deuten darauf hin, dass diese – wenn überhaupt – nur in sehr geringem Maße stattfindet. Deshalb sollte im Folgenden festgestellt werden, ob eine Immunproteasom-Induktion während der EAE-Erkrankung auf Proteinebene nachzuweisen ist. Dazu wurden Lysate von Hirngewebe sowie daraus immunpräzipitierte und vollständig isolierte 20S Proteasomen mittels SDS-PAGE und Westernblot (siehe Abb. 15-17) sowie Westernblot nach 2D-PAGE (Daten nicht gezeigt) hinsichtlich ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung überprüft. Bei den folgenden Untersuchungen wurde das 20S Proteasom aus dem Großhirn bzw. Resthirn von Mäusen analysiert. Dabei umfasst der Begriff Resthirn alle Bereiche des Gehirns außer dem Großhirn. Das Resthirn besteht hauptsächlich aus Kleinhirn, Mittelhirn und Hirnstamm.

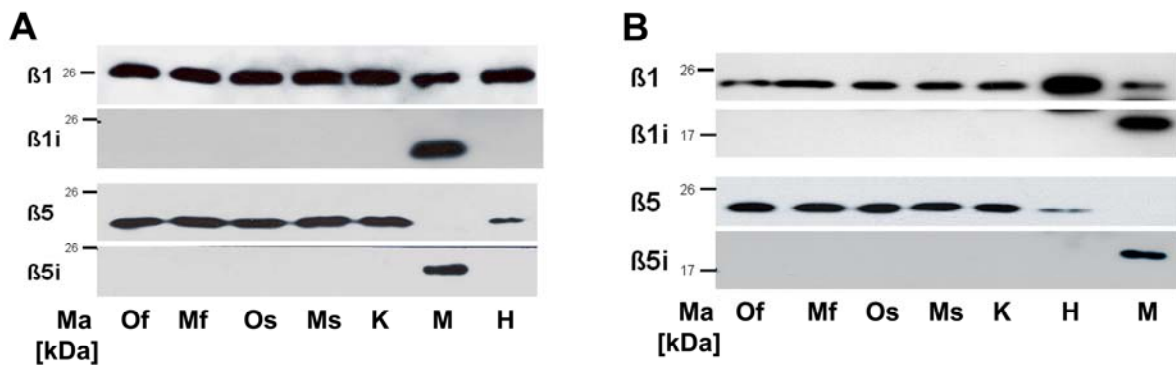


Abb. 15: Analyse der Untereinheiten-Zusammensetzung der 20S Proteasomen im Hirngewebe-Rohextrakt von Mäusen nach Induktion der EAE. Von jedem Rohextrakt (OVA früh (Of), MOG früh (Mf); OVA spät (Os), MOG spät (Ms) und Kontrolle (K)) wurden 300 μ g Protein per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteasom β -Untereinheiten im Westernblot nachgewiesen. Als Kontrollen dienten 20S Proteasomen (500 ng) isoliert aus Herz (H) und Milz (M). Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben. (A) Großhirn (B) Resthirn.

Wie in Abbildung 15 zu erkennen, sind in keiner der Tiergruppen - weder im Groß- noch im Resthirn - Immunproteasom-Untereinheiten detektierbar. Um zu überprüfen, ob dieses negative Resultat nicht auf zu geringen Probenmengen, d.h. Proteasom-Konzentration, beruht, wurden 20S Proteasomen aus den Rohextrakten immunpräzipitiert und isoliert. Um ausreichende Mengen 20S Proteasom vollständig isolieren zu können, wurden Hirne von je 10 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt für eine Präparation vereinigt (Groß- und Resthirn).

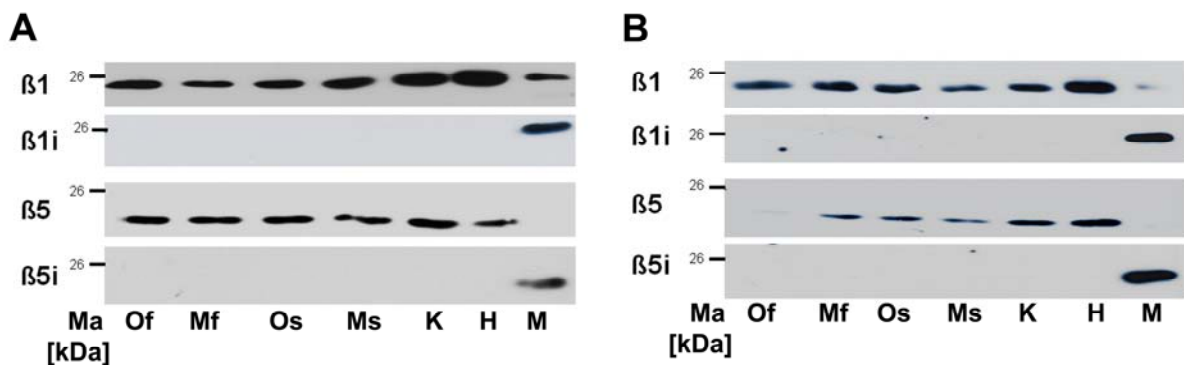


Abb. 16: Analyse der Untereinheiten-Zusammensetzung der Proteasomen nach Immunpräzipitation aus 300 μ g Rohextrakt vom Hirngewebe von Mäusen nach Induktion der EAE. Präzipitierte Proteine (Kontrolle (K), OVA früh (Of), OVA spät (Os), MOG früh (Mf) und MOG spät (Ms)) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteasom β -Untereinheiten im Westernblot nachgewiesen. Als Kontrollen dienten 20S Proteasomen (500 ng) isoliert aus Herz (H) und Milz (M). Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben. (A) Großhirn (B) Resthirn.

Auch nach einer Anreicherung von Proteasomen mittels Immunpräzipitation (Abb. 16) konnten keine Immunproteasom-Untereinheiten mittels Westernblot detektiert werden. Das Gleiche gilt für die isolierten Proteasomen (Abb. 17). Auch in Immunblots nach 2D-PAGE konnten keine Immunproteasom-Untereinheiten gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

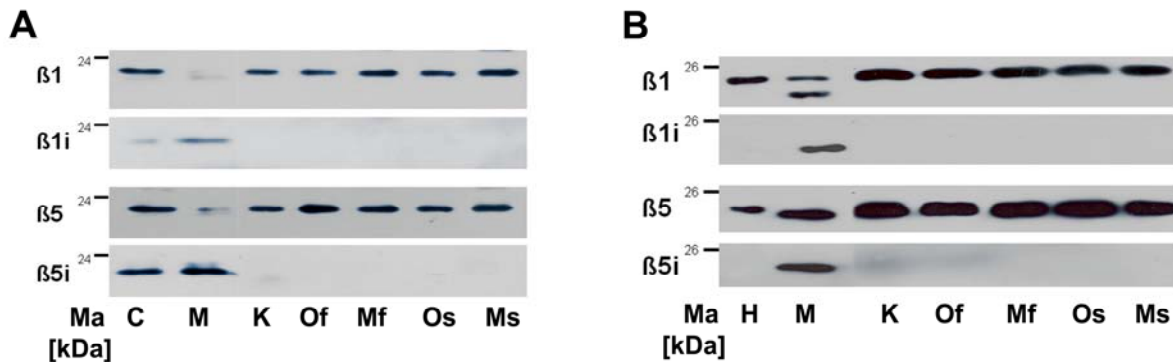


Abb. 17: Analyse der Untereinheiten-Zusammensetzung der 20S Proteasomen isoliert aus dem ZNS von Mäusen nach Induktion der EAE. 500ng isoliertes Proteasom (Kontrolle (K), OVA früh (Of), OVA spät (Os), MOG früh (Mf) und MOG spät (Ms)) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteasom β -Untereinheiten im Westernblot nachgewiesen. Als Kontrollen dienten 20S Proteasomen (500 ng) isoliert aus Colon (C) und Milz (M) bzw. Herz (H) und Milz (M). Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben. (A) Großhirn (B) Resthirn.

Im Gegensatz zu diesen Befunden in Hirnproben, konnten im Lysat des Rückenmarks von MOG Tieren mit einem Score-Wert von 2,0 – also Mäuse mit deutlichen Symptomen (TPL + HPA + RRW) einer EAE (Abb. 18 B) - die Immunproteasom-Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ eindeutig detektiert werden, nicht jedoch im Rückenmark von Mäusen mit einem Score-Wert von 0,75 (Abb. 18 A). Es wird davon ausgegangen, dass eine EAE aus der Peripherie in das ZNS gelangt. Dabei verläuft die Schädigung vom Rückenmark aus in das Gehirn. Bei einem Score-Wert von 2 (TPL & HPA & RRW) sind die Schädigungen im Rückenmark somit größer als bei einem Score-Wert von 0,75 (zwischen TPA und TPL). Dies kann bedeuten, dass mehr Zellen mit Immunproteasom existieren, so dass dieses im Westernblot nachweisbar ist.

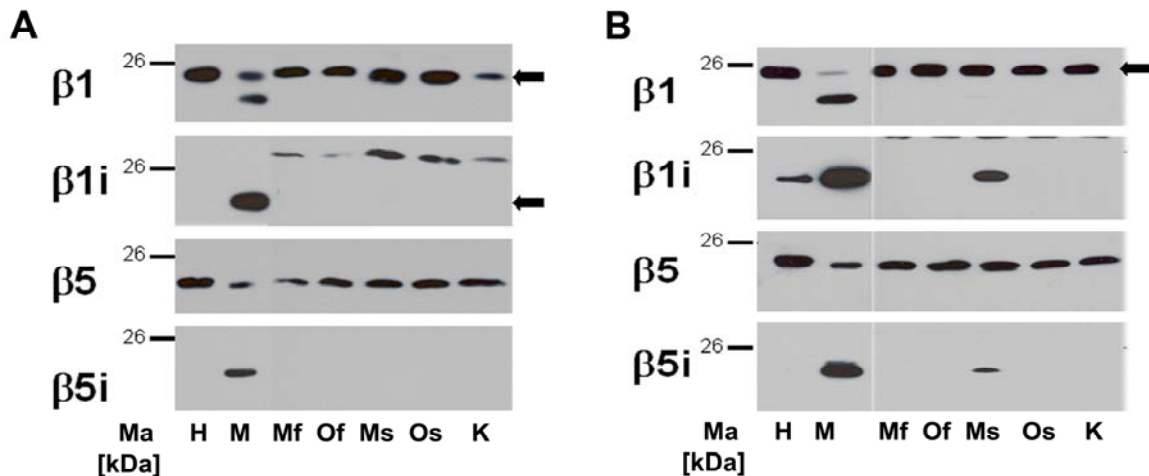


Abb. 18: Analyse der Untereinheiten-Zusammensetzung der 20S Proteasomen im Rückenmark von Mäusen nach Induktion der EAE. Von jedem Rohextrakt (Kontrolle (K), Ova früh (Of), Ova spät (Os), MOG früh (Mf) und MOG spät (Ms)) wurden 100 μ g Protein per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteasom β -Untereinheiten im Westernblot nachgewiesen. Als Kontrollen dienten 20S Proteasomen (500 ng) isoliert aus Herz (H) und Milz (M). Der Größenstandard (Ma) ist in Kilodalton (kDa) angegeben. Schwarze Pfeile markieren die korrekte Bande (A) Rückenmarksllysate aus einer Maus mit dem Scoring-Wert 0,75 (B) Rückenmarksllysate aus einer Maus mit dem Scoring-Wert 2,0.

In den Versuchen mittels RNA-Array und Immunhistologie konnte eine Induktion bzw. Präsenz der Proteasomen-Untereinheit $\beta 5i$ detektiert werden. Da es sich bei der Induktion um sehr geringe RNA-Expressionswerte handelt und in der Immunhistologie die Zahl der Zellen, die die Immunproteasom-Untereinheit $\beta 5i$ exprimieren, im Vergleich zur Gesamtzellzahl des Gehirns verschwindend klein ist, ist es nicht überraschend, dass Immunproteasomen auf der Protein-Ebene nicht nachgewiesen werden können. Die überwältigende Mehrheit der Gehirnzellen generiert bzw. besitzt Standardproteasomen, wie in der Immunhistologie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

3.4.4 20S Proteasom im Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen - Vergleich ihrer Aktivitäten

Obwohl keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Untereinheiten Zusammensetzung der 20S Proteasomen aus Großhirn von Mäusen nach Induktion einer EAE im Vergleich zu Kontrolltieren detektierbar waren, so wurden dennoch ihre proteolytischen Aktivitäten detailliert verglichen (Abb. 19). Während die chymotrypsin-ähnliche Aktivität unverändert

bleibt, so beobachtet man ein Absinken der PGPH Aktivität in den mit OVA behandelten Tieren zu einem frühen Zeitpunkt. Diese Veränderung ist jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren. Im Vergleich zu den PGPH Aktivitäten der Tiere im „OVA früh“ Stadium sind die der Proteasomen in den Tieren der Gruppen „MOG früh“ und „OVA spät“ signifikant verändert. Diese Veränderung beruht jedoch nur auf der verminderten Aktivität der „OVA früh“ Proteasomen und wird daher nicht als relevant angesehen; denn im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ergeben sich keinerlei statistisch signifikante Veränderungen bei der PGPH Aktivität.

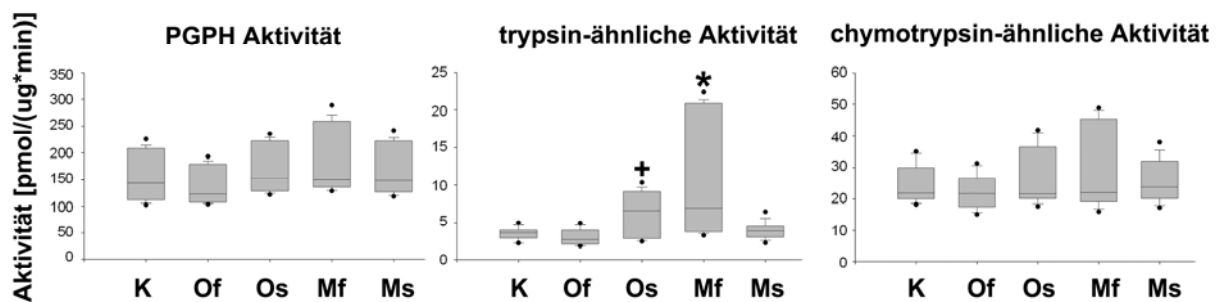


Abb. 19: Spezifische Aktivitäten [pmol/mg x min] der 20S Proteasomen aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion der EAE. Dargestellt ist ein Box-Plot mit Median (schwarze Linie), 5te und 95ste Perzentile als Balken, 25ste und 75ste Perzentile als Boxbegrenzung; Werte außerhalb dieser Abweichungsbereiche sind als Punkte dargestellt. Die trypsin-ähnliche Aktivität der 20S Proteasomen ist in den MOG Tieren zum frühen Zeitpunkt (Ms) und den OVA Tieren zum späten Zeitpunkt (Os) statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu der korrespondierenden OVA Gruppe (Of = OVA früh) oder den unbehandelten Tieren (K = Kontrolle); bei den kranken Tieren (Ms = MOG spät) entspricht die trypsin-ähnliche Aktivität wieder dem Kontrollniveau. Ein Stern (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,001$ und ein Plus (+) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ mit Rangsummen-Test ($n=3$) bezogen auf die unbehandelten Kontrollen.

Im Gegensatz dazu haben 20S Proteasomen, isoliert aus dem Großhirn prospektiv erkrankter Tiere („MOG früh“), im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe eine statistisch signifikant erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität (Abb. 19). Das Gleiche gilt auch für Proteasomen, die aus „OVA spät“ Tieren isoliert wurden. In erkrankten MOG Tieren („MOG spät“) ist die trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolltiere zurückgegangen.

Die Erhöhung der trypsin-ähnlichen Aktivität könnte auf einer Bildung von Immunproteasom beruhen, was jedoch durch die Westernblot-Experimente ausgeschlossen werden kann, in denen die Immununtereinheiten $\beta 5i$ (LMP7) und $\beta 1i$ (LMP2) nicht detektiert wurden (Abb. 17). Aktivitätsveränderungen können neben dem Austausch von katalytischen Untereinheiten

und Konformationsänderungen auch auf posttranslationalen Modifikationen beruhen. Viele posttranslationalen Modifikationen, z.B. Phosphorylierungen, Sulfonierung, Desaminierung, können die Oberflächen-Ladung und dadurch das chromatographische Verhalten von Proteinen beeinflussen. Diese Eigenschaft liegt den Untersuchungen über die Auftrennung von Proteasom-Subtypen zugrunde ([107, 108, 109, 110]), ein Aspekt, der im nächsten Experiment anhand des Elutionsverhaltens der gereinigten Proteasomen von einem starken Anionenaustauscher untersucht werden soll.

3.4.5 Veränderung der Oberflächenladung von Proteasomen mit veränderter Aktivität

Die Proteasomen wurden auf einer MiniQ PC2.3/2 Säule chromatographiert und mittels eines linearen NaCl Gradienten eluiert. In Abbildung 20 ist zu erkennen, wie die 20S Subtypen-Profile aus den MOG Tieren zum frühen Zeitpunkt (MOG früh) und den OVA Tieren zum späten Zeitpunkt (OVA spät) im Vergleich zu den Kontrollen und OVA früh bei niedrigerer Salzkonzentration vom Anionenaustauscher eluieren. Diese beiden Proteasomenarten (MOG früh und OVA spät) besaßen eine statistisch signifikant erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität. Die 20S Proteasomen aus den erkrankten MOG Tieren (MOG spät), welche ähnlich hohe trypsin-ähnliche Aktivitäten wie die Kontroll-Proteasomen besitzen, eluieren annähernd bei der gleichen Salzkonzentration wie die Kontroll-Proteasomen bzw. aus den OVA Tieren zum frühen Zeitpunkt (vergleiche auch Tabelle 6).

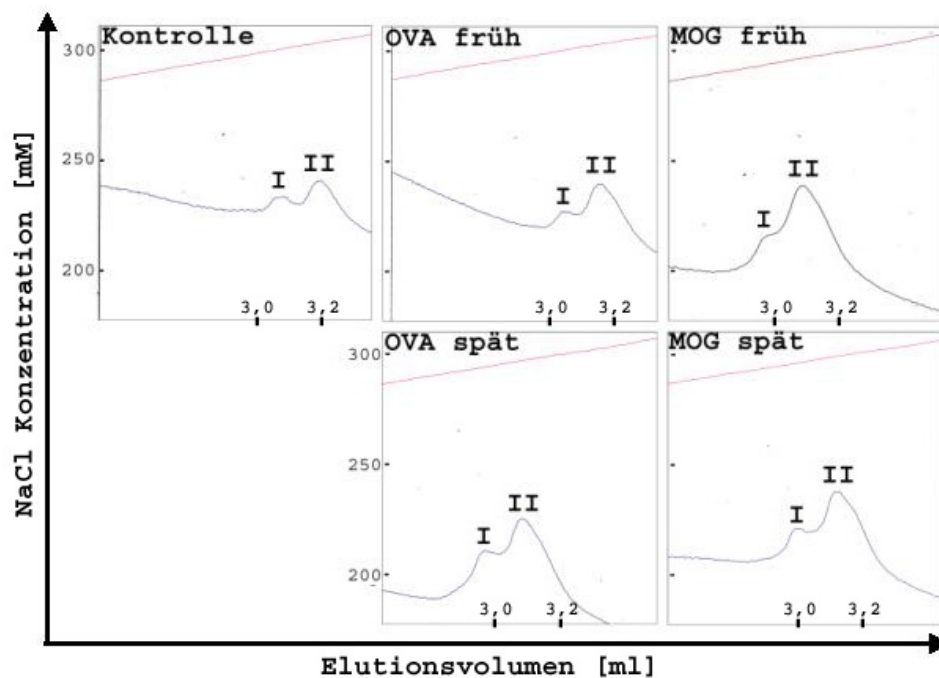


Abb. 20: Elutionsprofil der 20S Proteasomen auf der MiniQ PC3.2/3. Aufgetragen wurden 10 μ g isoliertes 20S Proteasom aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion der EAE. Zur Elution wurde ein linearer NaCl-Gradient bis 500 mM verwendet. Aufgetragen ist die NaCl-Konzentration [mM] gegen das Elutionsvolumen [ml]. Dargestellt ist nur der Ausschnitt, indem die Proteasom-Subtypen eluieren. Skaliert sind die Abbildung auf den NaCl Gradienten, so dass die Markierungen an den Ordinatenachsen identisch sind.

Tab. 6: Salzkonzentration an den Elutionspunkten der Hirn-Proteasom-Subtypen aus den verschiedenen Untersuchungsgruppen (vergleiche mit Abb. 17)

Gruppe	Elutionspunkte der Subtypen [mM NaCl]	
	I	II
Kontrolle	300	303
OVA früh	301	303
OVA spät	293	296
MOG früh	293	295
MOG spät	296	299

Es fiel auf, dass die untersuchten Gruppen das gleiche Proteasom-Subtypenpattern besitzen, welches im Laufe der Erkrankung unverändert bleibt. Das unterschiedliche Elutionsverhalten der Proteasomen mit erhöhter trypsin-ähnlicher Aktivität in der Anionenaustauscherchromatographie könnte ein Hinweis auf posttranslationale

Modifikationen oder Strukturveränderungen sein, die jedoch noch nicht näher bestimmt werden konnten.

Anzumerken bleibt, dass dieses Experiment auf Grund von geringen Mengen an gereinigten Proteasom nur einmal durchgeführt werden konnte und wiederholt werden muss, bevor gesicherte Aussagen über diese Beobachtungen getroffen werden können. Außerdem konnte auf Grund der geringen Menge der isolierten Proteasomen keine erneute Messung der proteolytischen Aktivitäten nach der Rechromatographie durchgeführt werden. Es ist daher nicht bekannt, ob sich die erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität einem oder beiden Proteasom-Subtypen zuordnen lässt.

3.5 Epitop-Generierung der Proteasomen isoliert aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion einer EAE

Da fluorogene Tripeptide, die zur Bestimmung der Proteasom-Aktivitäten *in vitro* benutzt werden, kaum Ähnlichkeit mit einem natürlichen Proteasom-Substrat haben, wurde eine weitere Charakterisierung hinsichtlich des Einflusses der partiellen Aktivitätsänderung der gereinigten Proteasomen aus „MOG früh“ und „OVA spät“ mit Hilfe eines MOG-Peptids als Substrat durchgeführt.

Für die Verdauexperimente wurde eine um sechs Aminosäuren N-terminal und sieben Aminosäuren C-terminal verlängerte Variante des MOG-Peptids (MOG 35-55), welches auch für die Immunisierungen der Mäuse benutzt wurde, verwendet. Die Sequenz ist in Abb. 21 gezeigt. In der Literatur lassen sich verschiedene Arbeiten finden, in denen versucht wurde, dass enzephalogene Epitop in MOG35-55 zu identifizieren (siehe dazu auch Einleitung). Es werden momentan zwei mögliche Epitope postuliert: MOG 37-46 (hier benannt als Epitop 1) [85] und MOG 40-48 (hier benannt als Epitop 2) [82] .

MOG 29-62	GKNATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQ A
MOG 35-55	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK
Epitope 1 MOG 37-46 V[9-18]R	VGWYRSPFSR
Epitope 2 MOG 40-48 Y[12-20]V	YRSPFSRVV
Epitope 3 MOG 42-50 S[14-22]L	SPFSRVVHL

Abb. 21: Sequenz des Peptidsubstrates für die Prozessierungsexperimente einschließlich der untersuchten Epitope und deren Lokalisation im MOG-Peptid

Bevor erste Degradationsexperimente durchgeführt wurden, wurde das Testpeptid in einem Proteasom-Schnitt (PAProC [97] und MHC-Klasse-I Bindungsprogrammen (MAPPP MHC-I binding prediction [98] und mhc-pathway.net [99]) analysiert, um weitere potentielle Epitope vorherzusagen.

Dabei wurde den Ergebnissen von MAPPP mehr Bedeutung beigemessen, da eine Vorhersage für die Bindung an Maus MHC-Klasse-I H-2K^b und H-2D^b (die auch die verwendeten Mäuse besitzen) möglich ist. Bei mhc-pathway.net beruht sowohl die Schnittvorhersage, als auch die MHC Bindung ausschließlich auf Daten, die mit humanen Proteinen erhoben worden sind. Das Gleiche gilt auch für das Schnittprogramm PAProC. Als relevant wurden nur mögliche Epitope eingestuft, die im Bereich von MOG 35-55 liegen, also in dem Peptid, welches für die Immunisierungsexperimente verwendet wurde.

Danach ergibt sich als wahrscheinlichstes potentielles Epitop MOG42-50, welches im Folgenden als Epitop 3 bezeichnet wird (Abb. 21 und 23). Es wurde mit allen verwendeten Schnittprogrammen gefunden und liegt in der von Sun et al. definierten CD8+ Zellen stimulierenden und EAE auslösenden Region [84] . Bei diesem Epitop handelt es sich um ein H-2D^b bindendes 9mer Peptid. Auch die Epitope 1 und 2 wurden durch MAPPP als H-2D^b bindende Epitope vorhergesagt. Als H-2K^b Binder werden nur 8mer Peptide gefunden, worunter sich die um eine Aminosäure verkürzten Epitope 2 und 3 befinden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls mögliche Epitope sind die Fragmente W[11-19]V, S[17-25]N und E[8-16]F. Die ersten zwei wurden von mhc-pathway.net jedoch als nicht wahrscheinlich angegeben und nach Angaben von PaProC wurde keines der drei Fragmente begünstigt (Abb. 22). Alle drei wären aber ebenfalls H-2D^b Binder.

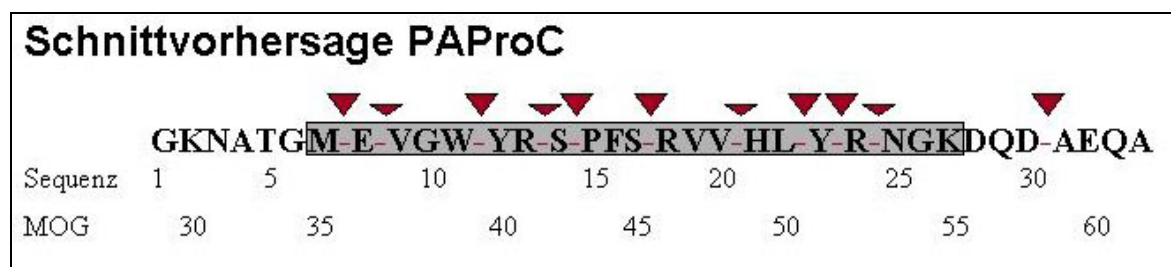


Abb. 22: Potentielle Schnittstellen in MOG29-62 nach PAProC mit „human Proteasome Typ III“ (humanem Erythrozyten-Proteasom), Vorhersage basiert auf Schnittkarten in Enolase- und Ovalbumin-Peptiden. Die Sequenz von MOG35-55 ist grau unterlegt. Potentielle Schnittstellen sind durch einen roten Strich bzw. Pfeilspitzen oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Große Pfeilspitzen bedeuten große, kleine Pfeilspitzen kleine Schnittwahrscheinlichkeit.

MAPPP MHC-I binding prediction	
H-2D^b 9mer	
GKNATG	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDDQDAEQA
(Epitop 3)	SPFSRVVHL (42,58 %)
	WYRSPFSRV (25,71 %)
	SRVVHLYRN (25,71 %)
	EVGWYRSPF (22,85 %)
	FSRVVHLYR (20 %)
(Epitop 2)	YRSPFSRVV (17,14 %)
	RSPFSRVVH (14,28 %)
	VGWYRSPFS (11,42 %)
H-2D^b 10mer	
GKNATG	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDDQDAEQA
	SPFSRVVHLY (42,85 %)
	WYRSPFSRVV (25,71 %)
	SRVVHLYRNG (25,71 %)
	EVGWYRSPFS (22,85 %)
	FSRVVHLYRN (20 %)
	YRSPFSRVV (17,14 %)
	RSPFSRVVHL (14,28 %)
(Epitop 1)	VGWYRSPFSR (11,42 %)

Abb. 23: Potentielle Epitope im Peptid MOG29-61 mit dem Vorhersageprogramm MAPPP MHC-I binding prediction. Suche nach 8, 9 und 10meren für H-2Db MHC-Moleküle mit der „SYFPEITHI“ Matrix als Standardeinstellung. Grau unterlegt ist das Peptid MOG35-55; blau unterlegt die Epitope 1-3. Die Prozentangaben in Klammer geben den Prozentwert von der maximal erreichbaren Punktzahl an.

Bei der Vorhersage durch mhc-pathway.net wurde als Proteasomen-Typ ‚constitutive‘ bzw. ‚constitutive enhanced‘ verwendet, da in der Westernblot-Analyse keine Immununtereinheiten im Hirn-Proteasom detektiert wurden. Bei der Analyse wurde nach 9-11meren gesucht und erneut die Epitope 1 bis 3 gefunden (Daten nicht gezeigt).

Als nächster Schritt wurden Vorversuche mit Proteasomen isoliert aus Herz, Milz und Großhirn von 12 Wochen alten BL6-Mäusen durchgeführt, um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Schnitte vom Proteasom gesetzt werden und ob sich Unterschiede zwischen Standard- und Immunproteasom zeigen. Dabei wurde das Proteasom aus Milz (später bezeichnet als Milz-Proteasom) als Immunproteasom und das Proteasom aus Herz (später bezeichnet als Herz-Proteasom) und Großhirn (später bezeichnet als Hirn-Proteasom) als Standardproteasom betrachtet.

Es wurden jedoch keine für Immun- oder Standardproteasom spezifischen Schnitte innerhalb des MOG 29-62 Peptides gefunden. Eine vollständige Schnittkarte ist in Abbildung 24 wiedergegeben.

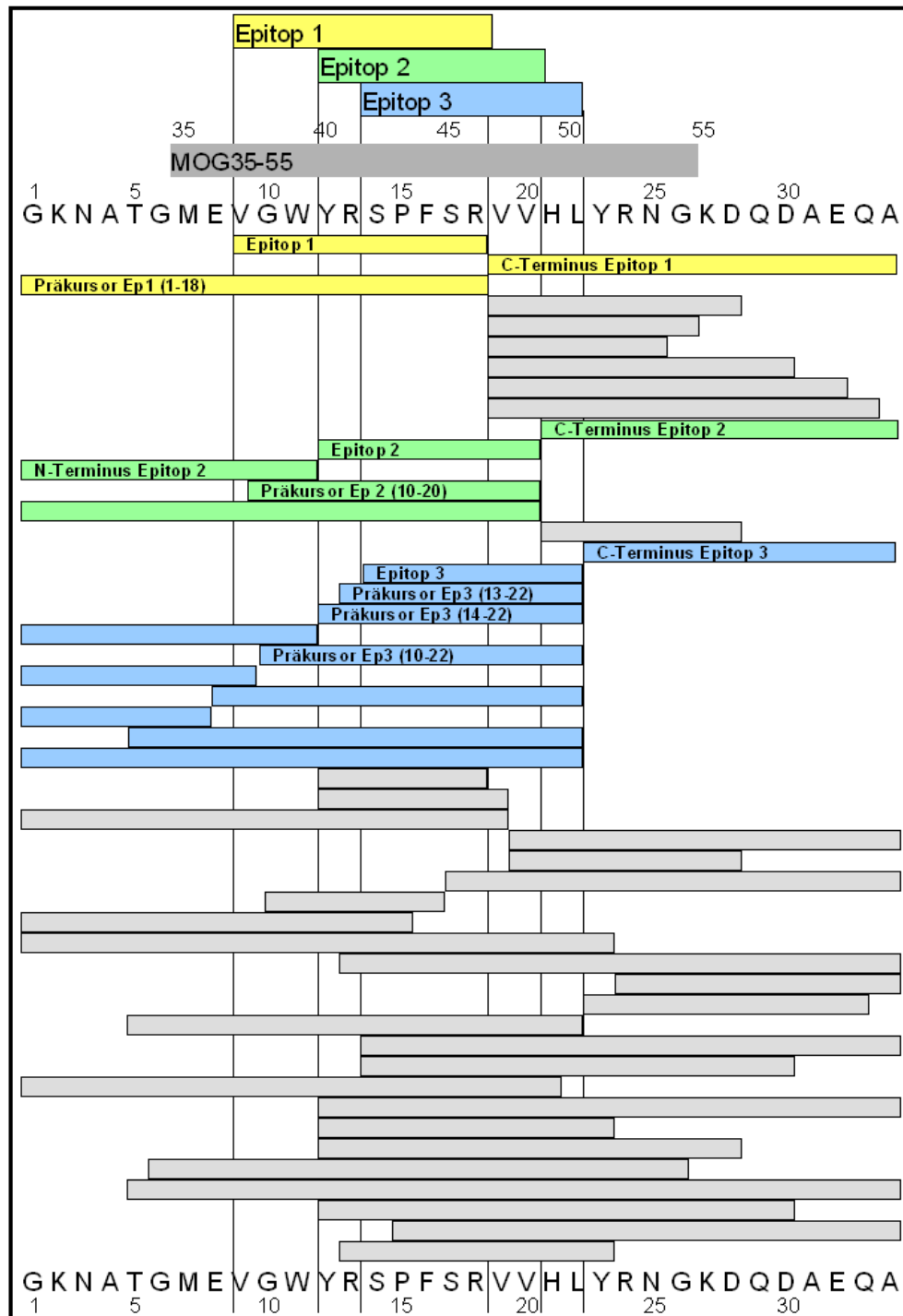


Abb. 24: Schnittkarte des MOG29-62 Peptides aus den Verdauungsansätzen mit Herz-, Hirn- und Milz-Proteasom isoliert aus der Maus. Dargestellt ist die komplette Schnittkarte von identifizierten Fragmenten aus den Prozessierungsexperimenten mit Herz-, Hirn- und Milz-Proteasomen.

Von allen drei Epitopen wurden die korrekten C-Termini gefunden, jedoch nur von Epitop 2 auch der N-Terminus. Für Epitop 1 wurde ein sehr langer potentieller Vorläufer detektiert, was auch für Epitop 2 gilt. Zusätzlich wurde für Epitop 2 ein um zwei Aminosäuren verlängerter Präkursor identifiziert. Gleich mehrere Vorläufer (insgesamt sechs) und deren N-Termini wurden für Epitop 3 gefunden. Bei näherer Betrachtung der Sequenz von Epitop 3 fällt das Prolin an zweiter Position am N-Terminus auf, was eine effiziente Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) über den TAP (*transporter associated with antigen processing*) unterbindet [111, 112]. Deshalb müssen die um 1, 2 und 4 Aminosäuren verlängerten Präkursoren in die Auswertung mit einbezogen werden, da für sie eine höhere Wahrscheinlichkeit des Transportes in das ER besteht. Auch die Vorläufer des Epitops 3 werden von dem Milz-Proteasom deutlich besser generiert als von Herz- und Hirn-Proteasomen.

Die drei weiteren vorhergesagten Epitope W[11-19]V, S[17-25]N und E[8-16]F konnten massenspektrometrisch nicht eindeutig identifiziert werden. Außerdem konnten auch mehrere Epitop zerstörende Schnitte gefunden werden.

Betrachtet man die Substratabbaurate (Abb. 25), so fällt auf, dass Herz- und Milz-Proteasomen nahezu identische Abbauraten haben mit einem halb-maximalen Substratumsatz nach ca. 6 Stunden. Das Hirn-Proteasom degradiert das MOG-Substrat deutlich langsamer, mit halb-maximalem Substratumsatz nach ca. 12 Stunden. Dem zur Folge sollte das Hirn-Proteasom weniger (etwa halb so viel) von einem Fragment in gleicher Zeit wie Herz- und Milz-Proteasom produzieren, wenn es die Schnitte mit gleicher Häufigkeit / Effektivität setzt.

Diese Tatsache trifft für die Generierung von Epitop 1 zu (Abb.25). Für Epitop 1 beobachtet man eine kontinuierliche Fragment-Zunahme bei dem Verdau mit Hirn-Proteasom. Bei dem Prozessierungsexperiment mit Herz und Milz-Proteasomen ist bis ca. 12 Stunden eine Zunahme und anschließend eine Abnahme an Epitop 1 zu verzeichnen. Dabei entspricht die Menge an generiertem Epitop vom Hirn-Proteasom bei 12 Stunden in etwa der Menge vom 4-6 Stundenwert vom Herz- und Milz-Proteasom. Das Gleiche trifft für einen Vergleich der Menge bei 24 Stunden Verdauzeit mit Hirn-Proteasom und 12 Stunden bei Herz- und Milz-Proteasom zu. Die Abnahme an Epitop 1 nach 12 Stunden bei Herz- und Milz-Proteasom lassen einen Wiedereintritt dieses Fragmentes in das Proteasom vermuten. Die Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses steigt nach etwa 50%igem Substratumsatz an, der für

diese beiden Proteasomen bei ca. 6 Stunden liegt. Betrachtet man die Bildung des C-Terminus von Epitop 1 so ergibt sich ein anderes Bild. Es ist kein Abbau dieses Fragmentes nach 12 Stunden zu erkennen. Der C-Terminus wird vom Milz-Proteasom etwa doppelt so gut generiert wie vom Hirn-Proteasom. Dies entspricht den Erwartungen, weil das Milz-Proteasom einen doppelt so hohen Substratumsatz wie das Hirn-Proteasom hat. Das Herz-Proteasom ist wesentlich besser in der Bildung des C-Terminus als die anderen beiden Proteasomenarten. Es scheint die Generierung dieses Fragmentes zu bevorzugen. Die Kurven für die Generierung des C-Terminus stimmen sehr gut mit der Generierung des Vorläufers von Epitop 1 überein.

Epitop 2 wird von allen drei Proteasom-Arten etwa gleich gut gebildet, ebenso wie der um zwei Aminosäuren verlängerte Vorläufer (Abb. 25) und der C-Terminus. Man beobachtet eine fast stetige Zunahme der Fragmente. Auch hier entspricht der 12 Stundenwert an generiertem Fragment beim Hirn-Proteasom in etwa wieder dem 4-6 Stundenwert des Milz- bzw. Herz-Proteasoms.

Epitop 3 und seine Präkursoren werden hingegen viel besser vom Milz-Proteasom produziert (Abb. 25). Herz- und Hirn-Proteasom generieren das Epitop 3 und die Präkursoren 13-22 und 12-22 gleich gut. Das Hirn-Proteasom ist folglich doppelt so effektiv wie das Herz-Proteasom, jedoch ist die Generierung von Epitop 3 und seiner Vorläufer deutlich durch das Immunproteasom begünstigt. Nach 6 Stunden sind die Intensitäten für die Bildung der Präkursoren 13-22 und 10-22 durch das Milz-Proteasom 60- und 40-fach höher als für das Hirn-Proteasom.

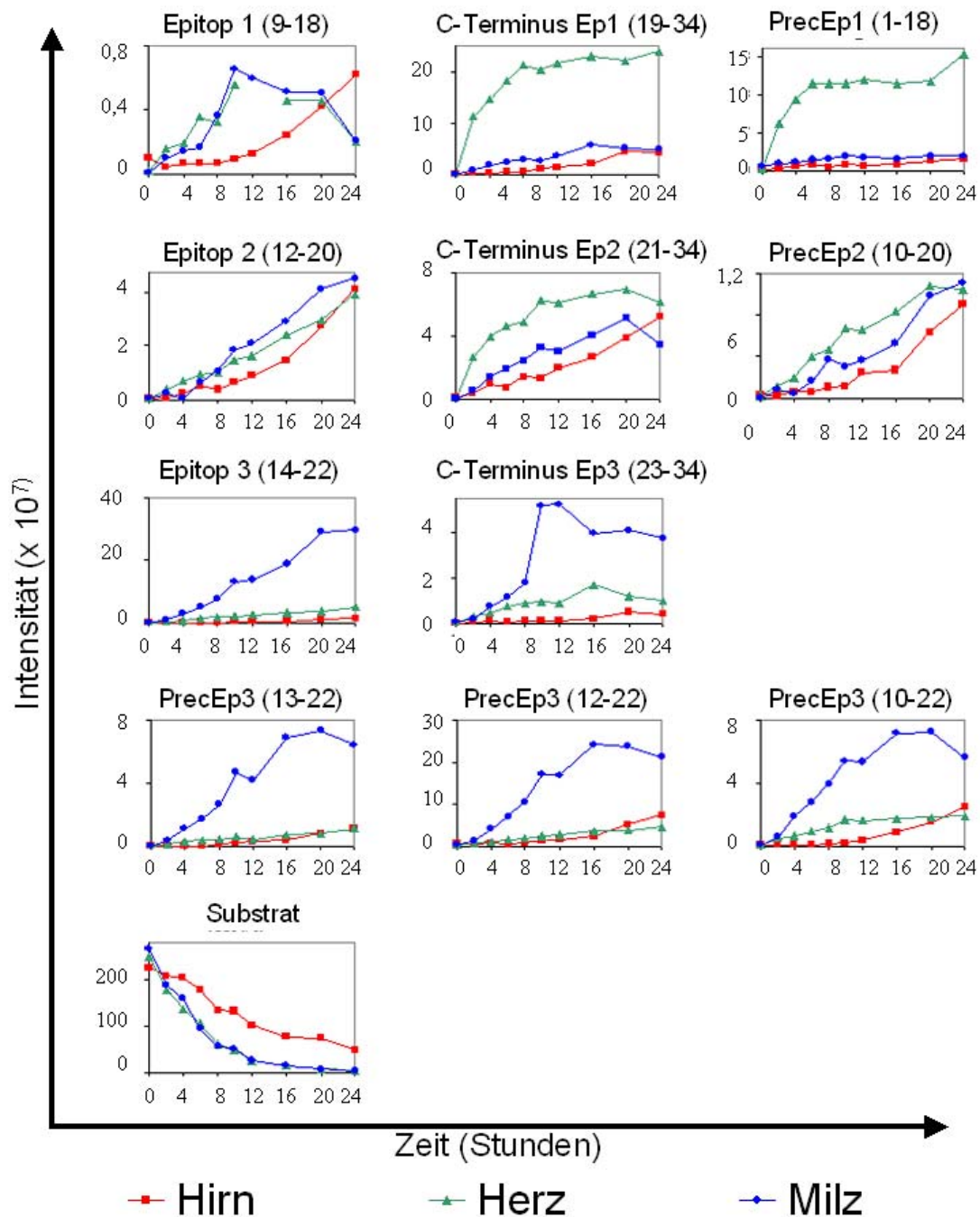


Abb. 25: Abbau des MOG-Peptides 29-62 und Epitopgenerierung durch 20S Proteasomen isoliert aus Herz, Hirn und Milz der Maus. Eingesetzt wurden jeweils 2µg Proteasom und 20µg Substrat pro Ansatz in Verdauerpuffer (2mM Hepes pH 7,8, 20mM Magnesium-Acetat, 0,2mM DTT). Abgestoppt wurde der Verdau nach den angegebenen Zeitwerten mit 1/10 Volumen 3% TFA. Dargestellt sind die gemessenen Intensitäten $\times 10^7$ zu den untersuchten Zeitpunkten. Der Messwert für Epitop 1 bei dem Verdau mit Hirn-Proteasomen war fehlerhaft und wurde nicht mit in die Grafik eingefügt. Die Abkürzung Ep und PrecEp stehen für Epitop und Präkursor Epitop. Die Zahlenangaben in Klammern in den Überschriften bezeichnen die erste und letzte Position des gebildeten Fragmentes innerhalb des Substrates.

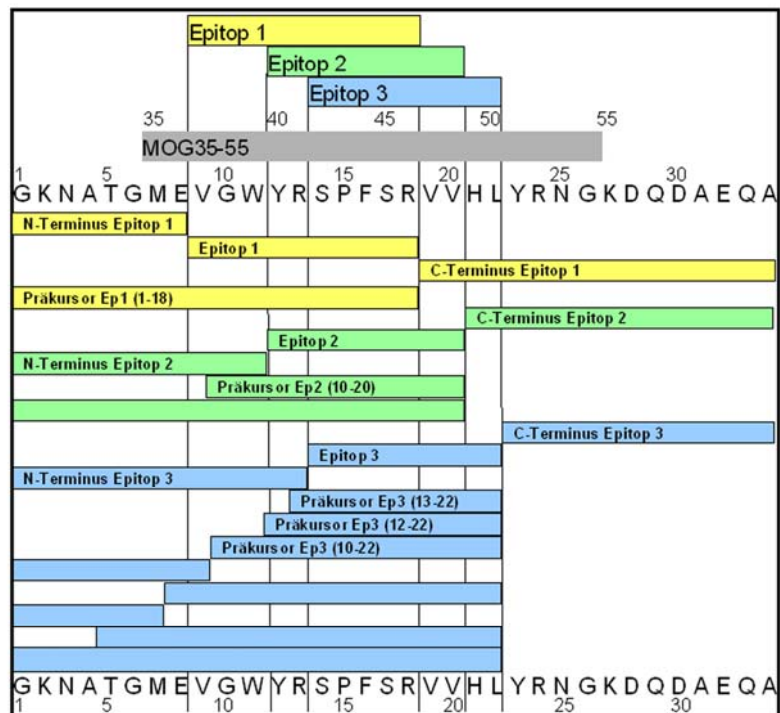
Bei den Experimenten mit den EAE-Proteasomen wurde das Hauptaugenmerk auf die Generierung der drei Epitope, ihrer C-Termini und die Präkursoren gerichtet. Auf Grund der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurde das betrachtete Zeitfenster auf 6-24 Stunden gesetzt. Es wurde versucht, die drei potentiellen Epitope W[11-19]V, S[17-25]N und E[8-16]F zu identifizieren, was jedoch nicht eindeutig gelang.

In den durchgeführten Peptidabbauexperimenten sollte ermittelt werden, ob die Proteasomen mit erhöhter trypsin-ähnlicher Aktivität im Vergleich zu denen ohne erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität ein verändertes Prozessierungsverhalten bzw. Schnittmuster gegenüber dem MOG-Peptid 29-62 aufweisen.

Die verkürzten Schnittkarten aus den Degradationsexperimenten mit den Hirn-Proteasomen aus den Mäusen nach Induktion von EAE sowie den Kontrolltieren sind in Abb. 26 wiedergegeben. In beiden Ansätzen konnten die drei Epitope mit ihren N- und C- Termini detektiert werden. Von Epitop 3 konnten erneut alle sechs Epitop-Präkursoren und deren N-Termini gefunden werden. Für Epitop 2 konnten drei mögliche Präkursoren gefunden werden, für Epitop 1 lediglich einer. Mit Ausnahme des längsten Präkursors für Epitop 2 (G[1-20]V) und zwei Präkursoren des Epitops 3 (G[1-22]L und T[5-22]L) sind alle anderen Vorläufer nicht länger als 8 Aminosäuren N-terminal verlängert und können somit theoretisch über den TAP-Transporter in das ER transportiert werden [113, 114] .

Alle identifizierten Fragmente wurden in allen Tiergruppen (Kontrolle, OVA früh, OVA spät MOG früh, MOG spät) gefunden oder aber in nur einem von zwei Experimenten. Somit konnte keine Schnittstelle gefunden werden, die in den Proteasomen mit erhöhter trypsin-ähnlicher Aktivität nicht oder vermehrt verwendet wird.

Schnittkarte Experiment 1



Schnittkarte Experiment 2

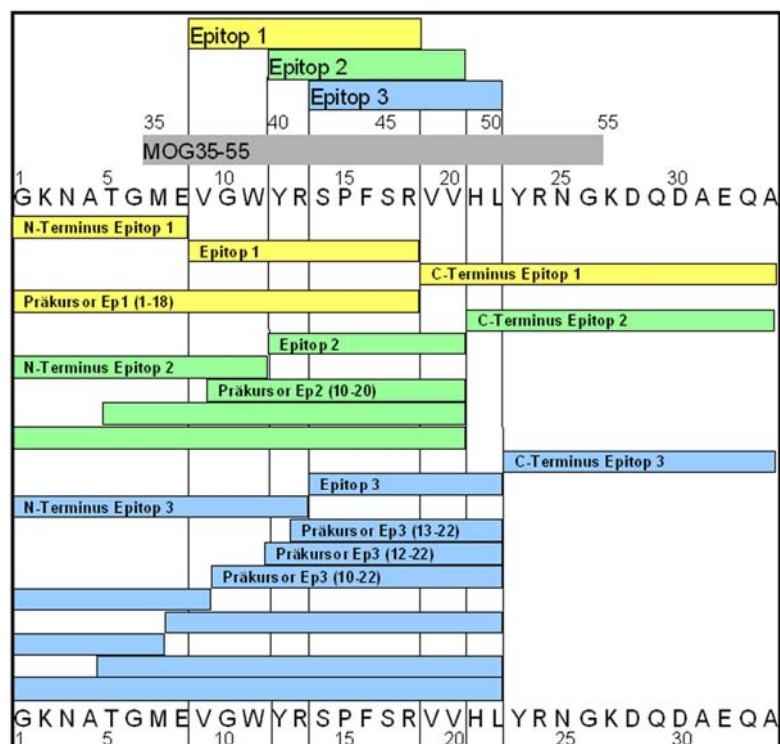


Abb. 26: verkürzte Schnittkarten der Prozessierungsexperimente 1 und 2. Verdaut wurde MOG29-61 mit Proteasom isoliert aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion der EAE. Dargestellt sind nur die Epitope mit ihren N- und C- Termini sowie deren Präkursoren mit dazugehörigen N-Termini, sofern diese identifiziert werden konnten.

Betrachtet man die Substratabbauraten bei gleichzeitiger Epitopgenerierung (Abb. 27 und 28), so fällt auf, dass Proteasomen isoliert aus den MOG Tieren ohne Symptome (MOG früh) das Substrat deutlich langsamer abbauen. Haben die anderen Proteasomen einen halbmaximalen Substratumsatz nach 6-12 Stunden, so haben die Proteasomen aus den MOG Tieren ohne Symptome sogar nach 24 Stunden das Substrat noch nicht halb umgesetzt. Nach 12 Stunden haben die Proteasomen isoliert aus den Kontrollen, den OVA-Tieren und den MOG Tieren mit Symptomen einer EAE (MOG spät) 60-70% des Substrates umgesetzt. In der gleichen Zeit haben die Proteasomen aus den MOG Tieren zum frühen Zeitpunkt in der EAE (MOG früh) gerade 20% Substrat abgebaut. Die anderen Proteasomen sind etwa drei mal schneller im Abbau des Substrates.

Trotz dieses stark verlangsamten Abbaus wird von Epitop 2 und seinen Vorläufern annähernd die gleiche Menge von allen Proteasomen gebildet (Abb. 27 und 28). Dargestellt ist nur die Generierung des Vorläufers G[10-20]V (Abb. 27 und 28). Die Kurven für die Generierung des Vorläufers T[5-20]V unterscheiden sich nur wenig von den abgebildeten (Abb. 28 PrecEp2 10-20). Die Tatsache, dass etwa gleiche Mengen an Epitop 2 und seines um zwei Aminosäuren verlängerten Vorläufers durch die verschiedenen Proteasomen gebildet werden, lässt den Schluss zu, dass die Proteasomen der „MOG früh“-Tiere (mit einem deutlich geringeren Substratumsatz) die Bildung dieser zwei Fragmente bevorzugen. Dieses Ergebnis ist in Abb. 29 anschaulich graphisch dargestellt. Aufgetragen ist die gemessene Intensität eines Fragmentes nach 12 Stunden Verdauzeit mit den Proteasomen isoliert aus den unterschiedlichen Tiergruppen (entnommen aus dem Experiment 1). Man erkennt deutlich das gleiche Mengen an Epitop2 bzw. des Präkursors (PrecEp2 (10-22)) von den Proteasomen der „MOG früh“-Tiere gebildet werden, bei nur einem Drittel des Substratumsatzes. Die Schnitte nach den Aminosäuren Valin (an Position 9 und 20) und Tryptophan (an Position 11) scheinen somit 3-mal häufiger zu erfolgen als bei den anderen Proteasomen (siehe dazu auch Generierung der Fragmente G[1-9]V und G[1-11]W weiter unten).

Im Gegensatz zu Epitop 2 wird Epitop 1 von Proteasomen aus prospektiv erkrankten Mäusen („MOG früh“) kaum generiert (Abb. 27-29). Für den Vorläufer von Epitop 1 (PrecEp1 (1-18)) ist das Ergebnis in den zwei Experimente nicht identisch. Wird der Präkursor 1-18 in Experiment 1 gut generiert, so wird er in Experiment 2 schlechter gebildet.

Auch für Epitop 3 sind die Ergebnisse nicht eindeutig, da es im ersten Experiment von allen Proteasomen vergleichbar gut gebildet wurde, im zweiten Experiment jedoch von den Proteasomen aus den unbehandelten Kontrollen und den „MOG früh“-Tieren kaum. Wie bereits angemerkt, besitze Epitop3 ein Prolin an der zweiten Position des N-Terminus, was zu einem ineffizienten TAP-Transport führt. Es ist daher anzunehmen, dass Vorläufer des Epitopes in das ER transportiert werden, wo sie von anderen Peptidasen auf die bevorzugte Länge von 8-10 Aminosäuren für MHC-Klasse-I Peptide gekürzt werden. Betrachtet man die Bildung der Präkursoren, so werden diese wieder relativ gleich effizient von allen Proteasomen gebildet (Abb. 27-29 PercEp3). Dies bedeutet eine effizientere Generierung der Vorläufer des Epitops 3 durch die Proteasomen isoliert aus den MOG Tieren ohne Symptome („MOG früh“), da diese einen deutlich geringeren Substratumsatz haben. Betrachtet man die Bildung der Vorläufer-Peptide nach 12 Stunden (Abb. 29), so ist das Proteasom der „MOG früh“-Tiere 2-3-mal effizienter als die anderen Proteasomen.

Des weiteren fällt auf, dass die Proteasomen isoliert aus den „MOG früh“-Tieren offensichtlich einen Schnitt nach den Aminosäuren 9 (Valin) und 11 (Tryptophan) des Substrates bevorzugen, da sie deutlich mehr Fragmente G[1-9]V (Fragment 1-9) und G[1-11]W (Fragment 1-11) im Vergleich zu den anderen Proteasomen generieren (Abb. 27-29). Die Bildung dieser zwei Fragmente führt zu einer Zerstörung des Epitops 1, was eine Erklärung für die geringe Bildung dieses Epitops sein kann. Zusätzlich führen diese beiden Schnitte zur Bildung der N-Termini des Epitops 2 und seines zwei Aminosäuren längeren Vorläufers (PrecEp2 (10-20)), sowie zur Bildung der N-Termini von zwei Präkursoren des Epitops 3. Gebildet werden die N-Termini des um zwei bzw. vier Aminosäuren verlängerten Epitops 3 (PrecEp3 (10-22) und PrecEp3 (12-22)).

Mit Ausnahme der Proteasomen aus den „MOG früh“-Tieren haben die anderen Proteasomen das Substrat nach ca. 12 Stunden zur Hälfte umgesetzt. Trotz dieser hohen Umsatzrate ist in der Regel bei den hier betrachteten Fragmenten kein Abbau nach 18 bzw. 24 Stunden zu erkennen. Anscheinend erfolgt kein Wiedereintritt der Fragmente in das Proteasom, was zu einem Abbau (und somit sinkenden Intensitäten) führen würde.

Experiment 1

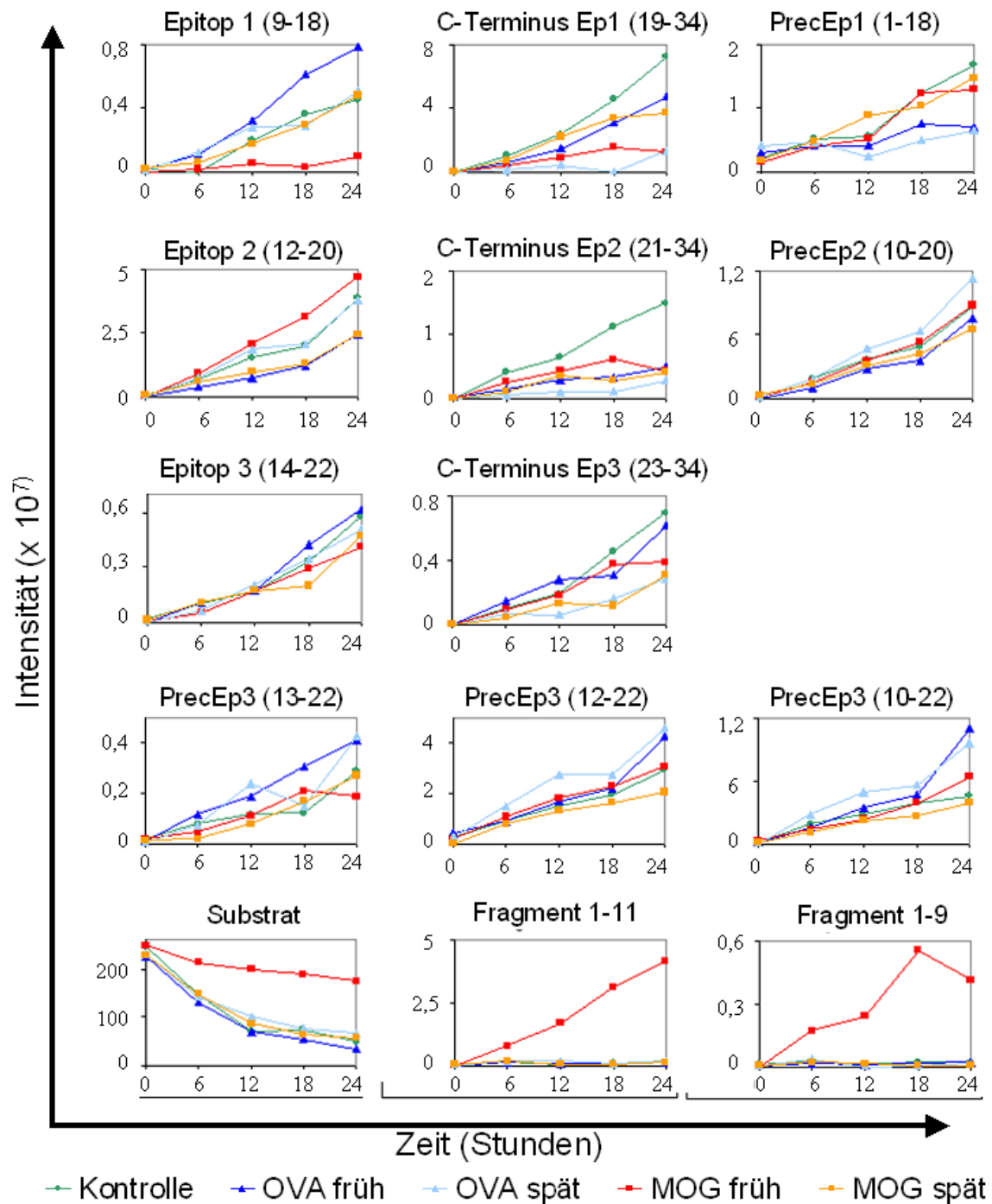


Abb. 27: Prozessierungsexperiment 1: Abbaurate des MOG-Peptids 29-62 und Epitopgenerierung, sowie Bildung der C-Termini und von Präkursoren (PrecEp) durch die Proteasomen aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion der EAE. Eingesetzt wurden jeweils 2µg Proteasom und 20µg Substrat pro Ansatz in Verdauerpuffer (2mM Hepes pH 7,8, 20mM Magnesium-Acetat, 0,2mM DTT). Abgestoppt wurde der Verdau nach den angegebenen Zeitwerten mit 1/10 Volumen 3% TFA. Dargestellt sind die gemessenen Intensitäten *10⁷ zu den untersuchten Zeitpunkten. In den Überschriften in Klammern angegeben sind die Aminosäureposition im Substrat von Anfang und Ende des gebildeten Fragmentes.

Experiment 2

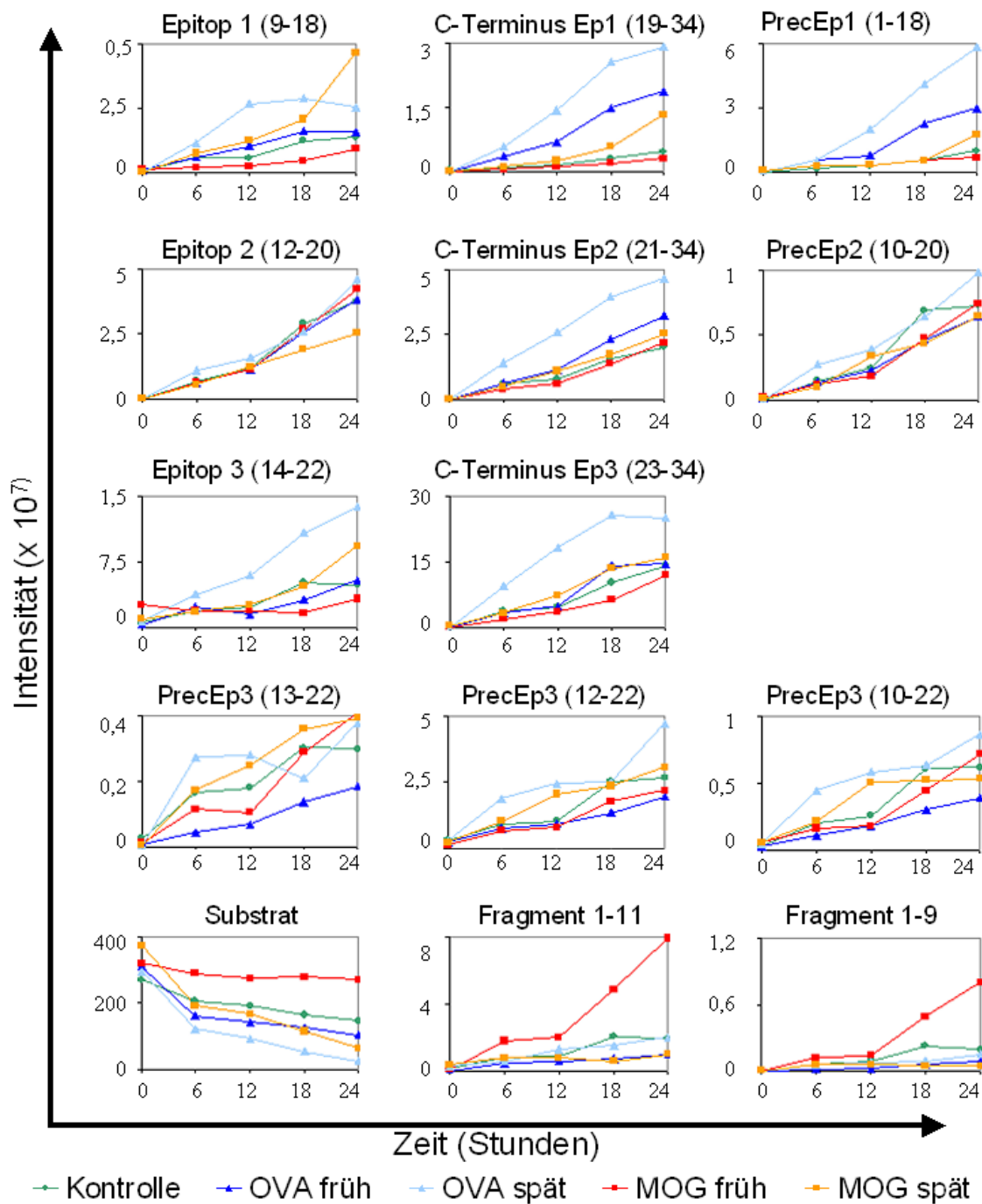


Abb. 28: Prozessierungsexperiment 2: Abbaurate des MOG-Peptids 29-62 und Epitopgenerierung, sowie Bildung der C-Termini und von Präkursoren (PrecEp) durch die Proteasomen aus dem Großhirn von Mäusen nach Induktion der EAE. Eingesetzt wurden jeweils $2\mu\text{g}$ Proteasom und $20\mu\text{g}$ Substrat pro Ansatz in Verdauerpuffer (2mM Hepes pH 7,8, 20mM Magnesium-Acetat, 0,2mM DTT). Abgestoppt wurde der Verdau nach den angegebenen Zeitwerten mit 1/10 Volumen 3% TFA. Dargestellt sind die gemessenen Intensitäten $\times 10^7$ zu den untersuchten Zeitpunkten. In den Überschriften in Klammern angegeben sind die Aminosäureposition im Substrat von Anfang und Ende des gebildeten Fragmentes.

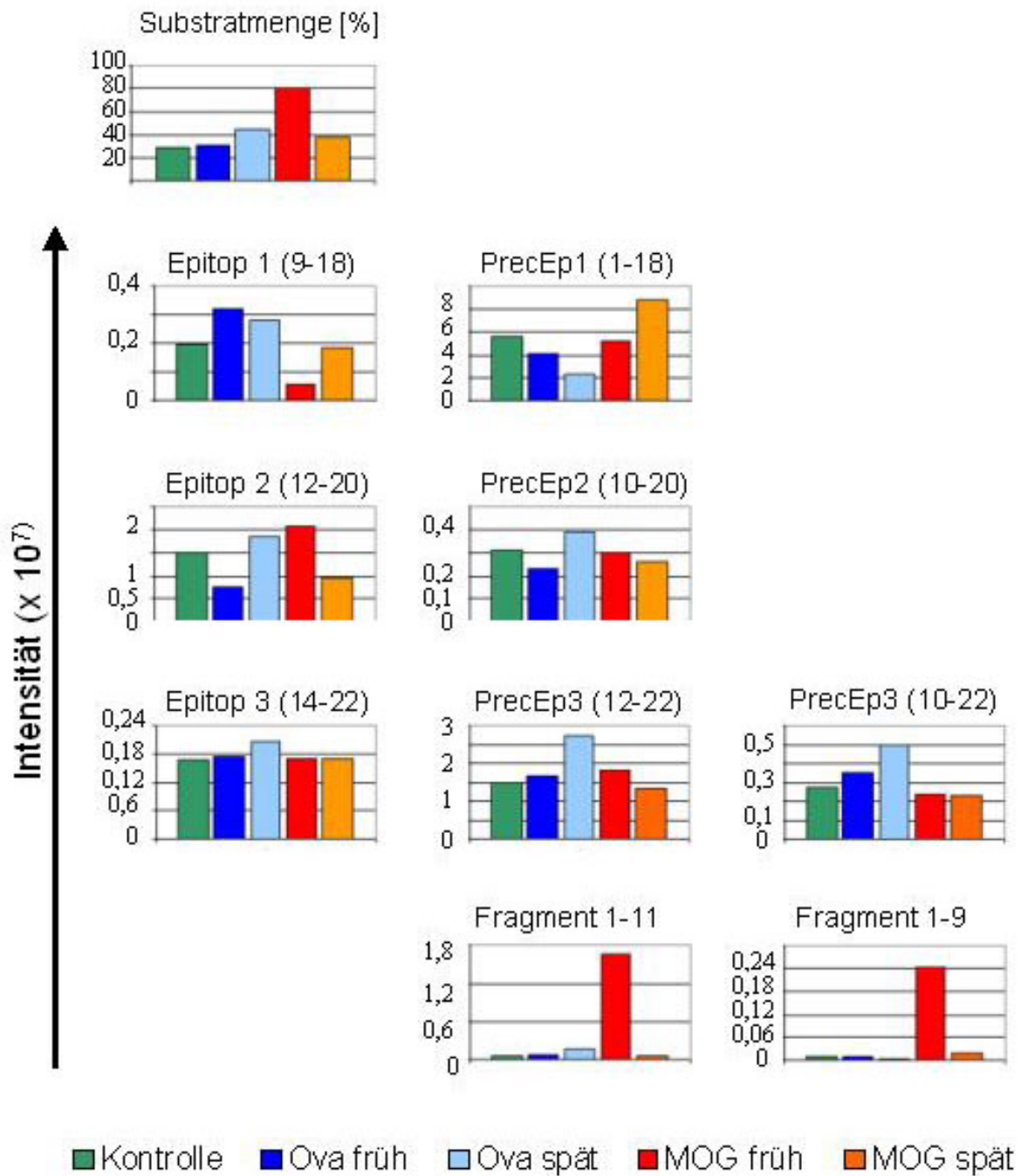


Abb. 29: Substratumsatz, Epitopgenerierung, und Fragmentbildung nach 12 Stunden Verdauzeit (entnommen Experiment 1). Dargestellt ist die Restmenge an Substrat nach 12 Stunden Verdauzeit in Prozent und die bis zu diesem Zeitpunkt generierte Menge an Epitopen 1-3, ausgewählter Vorläuferpeptide und den Fragmenten 1-9 und 1-11 als Intensitäten mal 10⁷.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse aus den Prozessierungsexperimenten den Schluss zu, dass Proteasomen der MOG Tiere ohne Symptome („MOG früh“) effektiver in der Epitop-Generierung von Epitop 2 und seinem Präkursor 10-20, sowie der Bildung der Präkursoren 10-22 und 12-22 des Epitops 3 sind als die aus den anderen Versuchstiergruppen isolierten Proteasomen. Trotz eines signifikant langsameren Abbaus des Peptidsubstrates MOG 29-62 bilden sie gleiche Mengen des Epitops 2 bzw. dessen Vorläufer-Moleküle. Die Proteasomen aus OVA Tieren zum späten Zeitpunkt der EAE („OVA spät“), die ebenfalls leicht erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität besitzen, zeigen diese Eigenschaft nicht. Sie verhalten sich weitgehend identisch mit den anderen Proteasomen (Kontrolle, OVA früh, MOG spät).

4 Diskussion

Obgleich seit langem bekannt ist, dass das Proteasom für die Majorität des intrazellulären Proteinabbaus verantwortlich ist und darüber hinaus eine entscheidende Rolle in vielen zellulären Prozessen spielt, steht die Erforschung des Proteasoms im Zentralnervensystem erst am Anfang. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass Inhibition des Proteasoms bzw. die Beeinflussung des UPS mit vielen neurologischen oder neurodegenerativen Erkrankungen einhergeht [15, 16, 17]. Durch seine zentrale proteolytische Funktion ist das Proteasom am Abbau vieler neuropathologisch interessanter Proteine wie Parkin und Amyloid-Precursor-Protein beteiligt [115]. Bei der Multiplen Sklerose (MS) könnte das Proteasom Autoantigene prozessieren, deren Epitope zur Autoimmunreaktion gegen das Myelin der Nervenfasern führen.

Die Ursachen, die zu MS führen, sind bisher noch weitgehend unbekannt. Das Einwandern von T- und B-Lymphozyten als auch Plasmazellen in die Weiße Substanz des Gehirns und Rückenmarks legt als Ursache eine Autoimmunerkrankung nahe. Es ist allgemein anerkannt, dass die T-Lymphozyten gegen Komponenten des Myelins gerichtet sind und aktivierte Mikroglia und Makrophagen zu einer Beschädigung der Myelinscheide von Nerven führen, wodurch es zu einer Störung der Nervenleitfähigkeit kommt. Lange Zeit galten CD4⁺ T-Zellen als vornehmlich verantwortlich für die Erkrankung. Vor allem Ergebnisse genetischer Assoziationsstudien gaben Anlass zu dieser Vermutung. Diese Ansicht begann sich zu wandeln, als man erkannte, dass die Depletion von CD4⁺ T-Zellen bei MS Patienten zu keinerlei Verbesserung führte, eine gemeinsame Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen jedoch Erfolg brachte [87]. CD8⁺ T-Zellen erkennen hauptsächlich Peptide von endogen synthetisierten Antigenen, die über das MHC-Klasse-I Molekül auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Aufgabe der Prozessierung von Antigenen intrazellulärer Herkunft übernimmt hauptsächlich das Ubiquitin-Proteasom-System.

Weil alle Glia- und auch neuronale Zellen in der Lage sind, MHC-Klasse-I Moleküle zu exprimieren [116], können sie alle mit an der Entstehung von MS beteiligt sein. Der Ort an dem CD8⁺ T-Zellen im Organismus erstmals MHC-Klasse-I Selbstantigen-Komplexe erkennen, ist bisher nicht bekannt. Oligodendrozyten und Neuronen scheinen die nötigen co-stimulierenden Moleküle, z.B. B7, zu fehlen. Bei Astrozyten kommt es auf jeden Fall nach

Stimulation zu einer Hochregulation von co-stimulierenden Molekülen, wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) [50] .

Die Astrozyten stellen die größte Gruppe unter den Gliazellen dar und besitzen vielfältige Funktionen. Dazu zählen auch Aufgaben bei der Immunantwort. Sie sind eine Hauptquelle der Chemokinproduktion im Gehirn, sezernieren pro- und anti-inflammatorische Zytokine und beeinflussen über verschiedene Faktoren Neurone, Mikroglia und Makrophagen in ihrer Umgebung [1] . Der enge und für Neurone essentielle Kontakt prädestiniert Astrozyten an der Entstehung neuronale Erkrankungen beteiligt zu sein und diese zu modulieren. Bei ihren Forschungen nach Ursachen für einen Neuronenverlust bei inflammatorischen Erkrankungen des ZNS beobachteten McPherson et al. (2006) ein Neuronensterben im Kleinhirn, dem ein durch CTL Antwort vermitteltes Astrozytensterben vorausging. In ihrem transgenen Mausmodell wurde β -Galaktosidase in Astrozyten produziert. Nach Injektion von β -gal spezifischen CTL's wurden die β -Galaktosidase produzierenden Astrozyten des Gehirns schnell von CD8⁺ T-Zellen attackiert. McPherson et al. beobachteten neben dem Kleinhirn auch in anderen Teilen des Gehirns, z.B. im Hippocampus, CD8⁺ T-Zell Infiltrate, diese führten jedoch zu keinen massiven Neuronenverlusten. Dieses Beispiel verdeutlicht, wie wichtig die Astrozyten für das Überleben der Neurone sind.

Aufgrund der essentiellen Aufgaben der Astrozyten für das ZNS und ihrer Beteiligung an der Immunantwort stellte sich die Frage, ob Astrozyten in der Lage sind, unter Immunstimulation Immunproteasomen zu exprimieren bzw. ob sie unter Inflammationsbedingungen wie einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis mit der Bildung von Immunproteasom reagieren.

4.1 Das 20S Proteasom in primären Astrozyten-Kulturen und in der Astrozyten-Zelllinie TSA-3

Nach bisher publizierten Daten besitzen Proteasomen isoliert aus dem Gehirn von Mensch, Ratte und Rind kaum bzw. keine Immunproteasom-Untereinheiten [18, 20, 21, 117] . Astrozyten bilden einen Großteil der Zellen des Gehirns, deshalb warzu erwarten, dass sie Standard-Proteasom besitzen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Untersuchungen mit

primären Astrozyten widersprechen diesem Bild jedoch teilweise. Sowohl in der 2D-PAGE als auch im Westernblot waren die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ sichtbar (Abb. 4 und 5). Im Westernblot konnte kein Unterschied zwischen stimulierten und nicht stimulierten primären Astrozyten detektiert werden (Abb. 5). Unstimulierte (ruhende) primäre Astrozyten zeigten im Westernblot eine etwa gleich starke Expression von Immunproteasom-Untereinheiten wie stimulierte Astrozyten der Zelllinie TSA-3 (Abb. 6). Aus Erfahrungen mit nicht-neuronalen Zelllinien, z.B. HeLa-Zellen, ist bereits bekannt, dass in Kultur gezogene Mammalia-Zellen auf fast jede Art von Stress unter anderem mit der Synthese von Immunproteasomen reagieren. Die Isolationsprozedur und anschließende Kultivierung von primären Astrozyten aus neugeborenen Mäusen könnte einen solchen Stressfaktor darstellen. Bei der Kultivierung der Astrozyten-Zelllinie TSA-3 gelang es jedoch unter Einhaltung einiger Vorsichtsmaßnahmen (Konfluenz <80%, vorgewärmtes Medium) Zellen heran zu ziehen, die keine Immunproteasom-Untereinheiten enthielten. Dieser Zelltyp zeigt nach Stimulation mit bakteriellen Antigenen (LPS) oder einem immunmodulatorischen Cytokin ($IFN\gamma$) eine Immunproteasom-Expression (Abb. 6).

Die Induktion von Immunproteasomen ist ein Teil der Immunantwort in Mammalia und soll eine effizientere Generierung von MHC-Klasse-I Epitopen bewirken [5]. Dabei ist nicht nur das Cytokin $IFN\gamma$ in der Lage Immunproteasom zu induzieren, auch die Typ I Interferone $IFN\alpha$ und $IFN\beta$ können die Bildung von Immunproteasomen z.B. im Rahmen einer Virusinfektion auslösen [118]. Auch andere Stimuli wie $TNF\alpha$ oder die Stimulierung von dendritischen Zellen können das Expressionslevel der Immunproteasom-Untereinheiten beeinflussen [5]. Die Induktion von Immunproteasom ist somit ein „normaler“ Vorgang im Rahmen einer Immunantwort, wobei es sich um ein transientes Ereignis handelt [119]. Auch andere Arten von Stress, wie oxidativer Stress, können zu einer Immunproteasom-Induktion im ZNS führen [120]. Das kein vollständiger Austausch von Standard- gegen Immununtereinheiten in Proteasomen erfolgt, ist ebenfalls schon früher in *in vivo* Experimenten beobachtet worden [121, 122, 123, 124, 125].

Die Astrozyten-Zelllinie TSA-3 verhält sich somit wie erwartet und vergleichbar mit anderen Zellen aus nicht lymphatischem Gewebe. Das auch LPS eine Immunproteasom-Induktion auslöst, lässt sich mit dem Vorhandensein von Toll-like Rezeptoren auf der Oberfläche von Astrozyten erklären [42, 44]. Astrozyten sind somit für den Stimulus empfänglich, der wie

INF γ eine Immunantwort auslösen kann. TSA-3 Zellen scheinen leicht stressanfällig zu sein, da bereits ein zu dichtes Wachstum der Zellen oder kaltes Medium zur Immunproteasombildung führt (Abb. 6 S). Besondere Vorsichtsmaßnahmen bei der Kultivierung lassen es jedoch zu, diese Zellen Immunproteasom-frei zu ziehen. Die Induzierbarkeit von Immunproteasom in Astrozyten ist biologisch sinnvoll, denn die Aufrechterhaltung eines optimalen Milieus für Neurone ist eine ihrer vornehmlichsten Aufgaben (siehe Einleitung 1.2). Sie sollten somit relativ sensitiv auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren.

Die gewonnenen Ergebnisse passen somit gut zu den bisher publizierten Daten, dass aus dem gesunden Gehirn von Ratte, Rind und Mensch isolierte Proteasomen überwiegend – wenn nicht sogar ausschließlich - Standard-Untereinheiten enthalten. In einigen Tiermodellen bzw. Untersuchungen von humanem Hirngewebe konnte jedoch gezeigt werden, dass Astrozyten unter Krankheitsbedingungen durchaus Immunproteasomen produzieren [22, 24, 58, 126] . Die Stimulation mit LPS oder INF γ sollte in den hier durchgeführten Versuchen eben solche Krankheitssituationen simulieren. Umso interessanter war es zu erfahren, ob sich die gleiche Antwort durch die Auslösung einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis induzieren lässt (siehe 4.3 EAE-Experimente der Maus).

4.2 Das 20S Proteasom im Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen

Da Astrozyten sich nur aus neonatalen Großhirnen von Mäusen isolieren ließen, nicht jedoch aus Hirnen adulter Tiere, andererseits aber eine experimentell autoimmune Enzephalomyelitis nur in adulten Tieren induziert ist, musste die Charakterisierung der 20S Proteasomen aus Großhirnen von adulten Mäusen während des Verlaufes einer experimentell induzierten EAE durchgeführt werden. Dazu wurde überprüft, ob sich die Proteasomen-Zusammensetzung bzw. die proteolytischen Aktivitäten in den Großhirnen von neugeborenen, 12 Wochen und 8 Monate alten Mäusen unterscheiden. Nach Literaturangaben bleibt die Menge an Immunproteasomen mit zunehmendem Alter gleich oder es kommt zu einer gesteigerten Expression [22, 101, 102, 103] .

Das aus dem Großhirn von Mäusen isolierte Proteasom enthielt unabhängig vom Alter der Tiere ausschließlich die konstitutiven Untereinheiten $\beta 1$ (delta), $\beta 5$ (MB1) und $\beta 2$ (Z). Immununtereinheiten waren weder im Westernblot noch durch 2D-PAGE detektierbar (Abb. 8 und 9). Diese Zusammensetzung deckt sich mit früheren Befunden von Akaishi et al. und Noda et al. [18, 20] . Im Gegensatz zu den Befunden aus Ratten- bzw. Maushirn konnten Picinini et al. [21] im 20S Proteasom aus humanen Hirnproben die Immununtereinheiten ($\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$) detektieren, jedoch überwog auch hier der Standardtyp.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ließen sich keine Veränderungen bezüglich der proteolytischen Aktivitäten bzw. der Untereinheiten-Zusammensetzung mit zunehmendem Alter im Großhirn der Maus feststellen (Abb. 7 -9). Dieses Ergebnis steht aber im Widerspruch zu den Daten anderer Gruppen, die eine Aktivitätsabnahme mit zunehmendem Alter festgestellt haben, teilweise verbunden mit einer Abnahme der Proteasommenge [101, 103, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135] . Andere Untersuchungen zeigten, dass die proteolytischen Aktivitäten der Proteasomen im Alter unverändert waren [102, 104, 136] . Auch die Beobachtungen zur Induktion von Immunproteasomen im Alter sind nicht einheitlich. Es wurde sowohl eine Zunahme an Immunproteasomen [22, 101, 102] als auch ein Gleichbleiben [103] der Proteasom-Zusammensetzung gefunden. Eine endgültige Aussage über proteasomale Veränderungen im Alter ist folglich im Moment nicht möglich. Diese Änderungen scheinen sowohl gewebs- als auch artspezifisch zu sein. Auch zeigen sich Unterschiede in den Ergebnissen basierend auf Zellen oder mit Geweben. Ein weiterer Grund für die konträren Ergebnisse könnte darin bestehen, dass viele Untersuchungen in Gewebe-Lysaten oder mit angereichertem Proteasom, andere hingegen mit vollständig isolierten Proteasomen durchgeführt wurden. Außerdem ist das in dieser Arbeit betrachtete Zeitfenster von Neugeborenen und maximal 8 Monate alten Tieren zu klein, um bei einer Lebenserwartung von 3-4 Jahren für Mäuse eine endgültige Aussage zu altersbedingten Veränderungen des Proteasoms treffen zu können.. Die bislang publizierten Befunde wurden vorwiegend an F344 Ratten erhoben, die in der Regel deutlich älter (häufig 25-28 Monate, aber auch 29-40 Monate) waren als die hier verwendeten Mäuse [101, 103, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135] .

4.3 EAE-Experimente

MS ist eine Erkrankung mit sehr heterogenem Verlauf; sie lässt sich in drei Verlaufsformen unterteilen: primär chronisch-progredient, sekundär chronisch-progredient und schubförmig remittierend [59]. Diese Heterogenität findet man auch im Tiermodell für MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Dabei sind verschiedene Maus- oder Rattenstämme für die Induktion von EAE durch Applikation unterschiedlicher Myelinbestandteile empfänglich. In einigen dieser Modelle konnte gezeigt werden, dass EAE durch den Transfer von CD8⁺ T-Zellen induziert werden kann [80, 81]. Sun et al. (2001) konnten zeigen, dass MOG35-55 spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Lage waren, EAE in WT BL6 Mäusen auszulösen, nicht jedoch in β 2-Mikroglubulin-defizienten Mäusen. Dabei traten mehr Infiltrationen im Gehirn als im Rückenmark auf. Huseby et al. (2001) zeigten die Existenz von MBP spezifischen CD8⁺ Zellen und deren enzephalogene Eigenschaften. Dabei löste eine passive im Vergleich zu einer aktiven Immunisierung eine stärkere Erkrankung aus, bei der das Gehirn stärker betroffen war (mehr Läsionen) als das Rückenmark. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell der MOG35-55 induzierten EAE in C57BL/6 Mäusen verwendet. Das Ziel war es Astrozytenveränderungen bzw. Veränderungen des 20S Proteasoms im Gehirn zu charakterisieren.

4.3.1 Transkriptionelle Expression von Immunproteasom-Untereinheiten und immunhistologischer Nachweis von Immunproteasomen in Gehirnen EAE erkrankter Mäuse

Zur Überprüfung, ob Astrozyten während der Inflammation einer EAE Immunproteasom generieren, wurden sagittale Hirnschnitte EAE erkrankter Mäuse auf eine Immunproteasom-Expression (mit einem anti- β 5i Antikörper) sowie Astrozyten-Aktivierung (mit einem anti-GFAP-Antikörper) mittels Immunfluoreszenz getestet. Nach Immunisierung kam es in den Bereichen der Hirn-Ventrikel, des Hippocampus und in der Kleinhirnrinde zu einer deutlichen Astrozyten-Aktivierung (Abb. 12-14). Signale vom Immunproteasom erschienen vor allem an den Gyri des Kleinhirns und am Rande sowie in den Ventrikeln, sowohl bei OVA als auch MOG Tieren (Abb. 13 und 14). In der OVA Gruppe verblieben die β 5i positiven Zellen in der Regel in den Ventrikeln, wohingegen bei den erkrankten MOG Tieren Signale mit dem β 5i

Antikörper im Hirnparenchym am Rand der Ventrikel gefunden wurden. Vermutlich sind $\beta 5i$ positive Zellen (vermutlich T-Zellen) in das Hirnparenchym infiltriert (Abb. 14). Es ließen sich kaum $\beta 5i$ positive Astrozyten finden. Einzige Ausnahme stellten die dendritischen Strukturen im Kleinhirn der MOG Tiere dar, in denen $\beta 5i$ teilweise eine Kolo-kalisation mit GFAP zeigte (Abb. 13 M und R).

Auch Luo et al. (2007) beobachteten eine Astrozyten-Aktivierung im Gehirn bereits vor dem Auftreten erster EAE-Symptome. Dabei konnten sie diese Aktivierung auf die Applikation von CFA zurückführen [137]. Dies würde sich mit den hier gezeigten Daten decken, bei denen es in den OVA wie auch den MOG immunisierten Tieren zu einer Astrozyten-Aktivierung kam. Beiden Tier-Gruppen wurde CFA und PTX verabreicht.

Brown et al. (2007) konnten bei immunhistologischen Untersuchungen zur Verteilung von Inflammationsherden bzw. neurodegenerativen Ereignissen in EAE Mäusen bereits vor dem Auftreten erster Symptome (an Tag 7) eine Mikroglia-Aktivierung an den Ventrikeln und der Hirnhaut, als auch eine steigende Zahl von T-Zellen im Hirnparenchym detektieren. Zu diesem Zeitpunkt wurden noch keine Veränderung im Rückenmark, mit Ausnahme der Rückenmarkshaut, beobachtet [138]. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Astrozyten und nicht Mikroglia untersucht, jedoch konnte auch eine Aktivierung in den prospektiv erkrankten Tieren gefunden werden, die unter anderem an den Ventrikeln erfolgte. Hirnhaut und Hirnparenchym waren nicht betroffen. Auch konnten keine Infiltrate im Parenchym zum frühen Zeitpunkt der EAE („MOG früh“) detektiert werden. Mit dem Auftreten der ersten Symptome an Tag 10-14 zeigten Brown et al. (2007) eine weitere Zunahme der Mikroglia-Aktivierung und T-Zell-Infiltrate am Plexus choroideus, den zirkumventrikulären Organen sowie an einzelnen Stellen der Hirnhaut. Die ersten perivaskulären Zellhaufen (*Cuffs*) wurden am rostralen Corpus callosum gefunden einhergehend mit Mikroglia-Aktivierung. Tiere mit einer erhöhten Anzahl an choroidalen T-Zellen zeigten auch Infiltrate in der Hippocampusregion am Gyrus dentatus. An Tag 10-14 konnte auch in der Rückenmarkshaut eine steigende Anzahl an T-Zell-Infiltraten festgestellt werden. Andere Hirnregionen zeigten eine sehr variable Beteiligung, wobei der cerebrale Cortex kaum oder gar nicht involviert war [138]. Diese Aussparung des Cortex stimmt mit den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit überein (Abb. 12). Im Hippocampus der erkrankten MOG Tiere konnten stellenweise Immunproteasom-positive Zellen gefunden werden (Abb. 12 S). Dabei könnte es sich um T-Zellen handeln. Am rostralen Corpus callosum wurden keine Infiltrate gefunden.

Costa et al. (2003) beobachteten Leukozyteninfiltrate assoziiert mit GFAP positiven Astrozyten an den lateralen Ventrikeln, der Hippocampusregion und im perivaskulären Raum um Blutgefäße im Gehirn bei erkrankten EAE Mäusen. Es konnte zudem eine deutliche Korrelation zwischen Symptomatik und Astrozyten-Aktivierung im Rückenmark gezeigt werden [139]. Dabei wurden Infiltrate lediglich in Tieren gefunden, die mit mehreren Antigen Peptiden (MOG-MAP) immunisiert worden waren, nicht aber in solchen, die nur mit dem MOG35-55 Peptid immunisiert worden waren, was nur zu einer milden EAE (Score-Wert <1) geführt hat. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen trotz einer Immunisierung mit MOG35-55 eine Astrozyten-Aktivierung in den auch von Costa et al. (2003) untersuchten Regionen detektiert werden. Allerdings entwickelten die Mäuse eine stärkere EAE (Score-Wert ≥ 1), was die unterschiedlichen Ergebnisse eventuell erklären kann.

Bei einem Vergleich der Histologie der MP4, MOG35-55 und PLP178-191 induzierten EAE beobachteten Kuerten et al. (2007) während der akuten Phase in allen drei Modellen deutliche Infiltrate an der Hirnhaut des Cortex, besonders im Bereich des Hippocampus, sowie des lateralen und dritten Ventrikels. Bei der MOG induzierten EAE fanden sich auch Infiltrate im Parenchym des Kleinhirns [140]. Auch diese Ergebnisse decken sich teilweise mit den Befunden in dieser Arbeit, in der Infiltration von Zellen in die Ventrikel, sowie in schwächerer Ausprägung in den Hippocampus und das Mark des Kleinhirns gefunden wurde.

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen kommt es bei anderen neuronalen Erkrankungen wie Chorea Huntington und Alzheimer anscheinend zu einer Immunproteasom Expression in Neuronen und Astrozyten [22, 24]. Weil die Aggregate bei Chorea Huntington häufig Antikörpern gegen Ubiquitin und das Proteasom binden, wird vermutet, dass das UPS bei dieser Erkrankung betroffen ist. Die meisten Einschlüsse sind im Striatum und dem Cortex lokalisiert. Diaz-Hernandez et al. (2003) fanden bei ihren Untersuchungen in HD94 Mäusen eine Induktion der Immununtereinheiten $\beta 1i$ /LMP2 und $\beta 5i$ /LMP7 in Cortex und Striatum im Westernblot nach dem Auftreten der ersten Symptome [24]. Immunhistologisch waren Immununtereinheiten hauptsächlich in Neuronen des Cortex zu finden, lediglich einige Astrozyten zeigten positive Signale. Im Striatum wurden entgegen den Ergebnissen, die mittels Westernblot erzielt worden waren, kaum $\beta 1i$ /LMP2 bzw. $\beta 5i$ /LMP7 positive Zellen gefunden. Mishto et al. (2006) detektierten in Hirnen von Alzheimer Patienten und älteren Kontrollpersonen die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ [22]. Bei der bisher einzigen Veröffentlichung zur Charakterisierung des 20S Proteasoms in humanen Glioblastomen

fanden Piccinini et al. (2005) in 12 von 18 Glioblastomen und entsprechendem Kontrollgewebe Immunproteasom-Untereinheiten [58].

Es ist anzunehmen, dass die in der Literatur [22, 24, 58] beschriebenen Faktoren, die zu einer Expression von Immunproteasomen in Astrozyten führen, sich von der Situation unterscheiden, die im hier beschriebenen EAE Experiment vorlag. Die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Beispiele aus der Literatur unterscheiden sich von den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimenten in zwei wesentlichen Punkten: (i) es werden andere Erkrankungen des ZNS untersucht und (ii) es werden andere Mausstämme bzw. humanes Material verwendet. Diese Unterschiede bilden vermutlich eine Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse.

Die sehr geringen Expressionswerte der Immununtereinheiten auf mRNA Ebene (Tab. 4, Abb. 10) decken sich gut mit den immunhistologischen Befunden, die nur relativ wenig $\beta 5i$ positive Zellen zeigen (Abb. 12-14). Demnach scheint es, dass zumindest in den hier durchgeführten EAE Versuchen eine Entzündung im Rahmen der EAE nicht ausreicht, um die Expression von Immunproteasom im Gehirn der Mäuse zu induzieren. Dabei kann die Tatsache, dass die EAE teilweise recht mild ausgeprägt war, durchaus eine entscheidende Rolle spielen. Nach gängiger Meinung verläuft die Schädigung während einer EAE vom Rückenmark aus in das Gehirn. Im Rückenmark von EAE-Mäusen mit einem Score-Wert von 2 konnten die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 18). Vielleicht ist eine stärker ausgeprägte EAE nötig, um auch eine Immunproteasom-Expression in Zellen des Großhirns nachweisen zu können. Außerdem konnte die mRNA von Faktoren wie $INF\alpha$, β und γ und $TNF\alpha$, die eine Immunproteasom-Induktion bewirken, auf den Affimetrix-Arrays nicht detektiert werden. Deshalb ist eine Zunahme an Immununtereinheiten nicht unbedingt zu erwarten.

4.3.2 20S Proteasom im Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen

Bezogen auf die Gesamtzellzahl existiert im gesunden Großhirn nur eine geringfügige Zahl von Zellen, in denen die Immununtereinheit $\beta 5i$ immunhistochemisch nachweisbar war und nach Induktion der EAE nahm diese nur unwesentlich zu. Auch die Menge der mRNA der Immununtereinheiten war relativ gering. Dementsprechend konnte auch bei den erkrankten Tieren kein vollständiges Immunproteasom mit den Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) und $\beta 5i$ (LMP7) gefunden werden (Abb. 15-17), mit Ausnahme des Rückenmarks bei

stärker erkrankten Tieren (Abb. 18). Dennoch fand eine geringfügige Veränderung der Proteasomen statt. Die trypsin-ähnliche Aktivität war in den Proteasomen, die aus den MOG-Tieren zum frühen bzw. OVA Tieren zum späten Zeitpunkt isoliert wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erhöht (Abb. 19). Welche Auswirkungen die veränderte trypsin-ähnliche Aktivität auf das Schnittverhalten der Proteasomen hat, wurde in *in vitro* Verdau-Experimenten mit isolierten Proteasomen und einem verlängerten MOG-Peptid untersucht (siehe 4.3.3).

Eine zufriedenstellende Erklärung für die erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität kann zur Zeit noch nicht gegeben werden. Wie bereits früher beobachtet worden ist, sind aus Gewebe oder Zellen gewonnene Proteasomen nicht homogen, sondern stellen gewebs- bzw. zell-spezifische Mischungen von 20S Proteasom-Subtypen dar, [107, 108, 109, 110] . Dieses Spektrum der Proteasom-Subtypen aus Maushirn veränderte sich im Laufe der EAE jedoch nicht (Abb. 20). Allerdings fiel auf, dass die Proteasomen mit größerer trypsin-ähnlicher Aktivität früher (bei niedrigerer Salzkonzentration) vom Anionenaustauscher eluierten als die Proteasomen mit unveränderter trypsin-ähnlicher Aktivität (Abb. 20). Da keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Untereinheiten des 20S Proteasoms nachgewiesen werden konnten, deutet das veränderte Elutionsverhalten bei der Anionenaustausch-Chromatographie auf eine veränderte Konformation und / oder Oberflächenladung durch posttranslationale Modifikationen hin. Die Auftrennung von 20S Proteasomen in der 2D-PAGE (Abb. 9) lässt erkennen, dass eine Untereinheit mit mehreren unterschiedlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten vorliegen kann, was auf posttranslationalen Modifikationen beruhen könnte [23, 96, 141, 142, 143] .

Die Modifikation, die eine Auswirkung auf die trypsin-ähnliche Aktivität hat, beeinflusst aber weder deutlich die isoelektrischen Punkte der Untereinheiten noch deren Molekulargewichte, da sie sonst in einer 2D-PAGE (Daten nicht gezeigt) sichtbar geworden wäre. Eine Modifikation, die diese Kriterien erfüllt, ist die Addition von β -O-gebundenem N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an Serin- oder Threoninreste im Protein. Das hierfür benötigte Enzym, die O-GlcNAc Transferase ist im Hirn stark exprimiert [144] . Es wird auch ein Zusammenhang zwischen O-GlcNAc Glykosylierung und einigen neuronalen Erkrankungen, wie Alzheimer [144, 145] und ALS (amyotrophic lateral sclerosis) diskutiert [144] . Sumegi et al. konnten in 2D-PAGE Western-Blots mit O-GlcNAc-spezifischen Antikörpern und dem Lektin *wheat germ agglutinin* (WGA) zeigen, dass neun der vierzehn 20S-Untereinheiten mit

O-GlcNAc modifiziert sind [146] . Wells et al. war es nach Affinitätschromatographie mit einen spezifischen O-GlcNAc-Antikörper als Liganden möglich, die 20S Proteasom-Untereinheit $\alpha 6$ zu isolieren [147] . Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Glykosylierung und Proteasomaktivität wurden 2003 von Zhang et al. für die ATPase-Aktivität der 19S-Regulator-Untereinheit Rpt2 publiziert. Durch eine erhöhte Glykosylierung wurde der Abbau hydrophober Substrate, wie Sp1 gehemmt. Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle im Zuckerhaushalt der Zelle spielt. Somit könnten die O-GlcNAc-Modifizierungen dazu dienen, die proteasomale Aktivität an den metabolischen Status der Zelle anzupassen [148] . Veränderungen im O-GlcNAc-Muster von Proteasomen aus Leber konnten nach *L. monocytogenes* Infektion detektiert werden. Die $\beta 1$ (delta) Untereinheit war weniger und die $\alpha 3$ Untereinheit deutlich stärker glykosyliert [121] . Eine Behandlung von 20S Proteasomen aus HeLaS3-Zellen mit Neuraminidase (aus *Arthrobacter ureafaciens*) führt zur Veränderung des Subtypen-Muster. Durch die Abspaltung eines oder mehrerer Neuraminsäurereste kam es vermutlich zum Verlust einer negativen Ladung bzw. zu Konformationsänderungen, aus denen Ladungsverschiebungen resultierten, was zu einem veränderten Elutionsprofil der Proteasom-Subtypen führte [149] .

Da die Mengen an isolierten Proteasomen in den hier durchgeführten Versuchen für eine weitere Analyse und Charakterisierung der Enzyme zu limitiert waren, sollte in künftigen weiterführenden Experimenten das Glycosylierungsmuster der Proteasomen aus dem Gehirn EAE erkrankter Mäuse detailliert untersucht werden. Die proteasomale Funktion wird nicht ausschließlich durch das Vorhandensein der Immununtereinheiten bestimmt, sondern eine Regulation der Aktivität ist auch durch posttranslationale Modifikationen möglich [96, 142, 148, 150, 151, 152, 153] .

4.3.3 Epitop-Generierung der Proteasomen aus dem Großhirn von gesunden und EAE erkrankten Mäusen

Ein Ansatz zur Behandlung von MS ist die Regulation der Immunantwort gegen Autoantigene des Myelins, ohne dabei eine generelle Immunsuppression hervorzurufen. Auf der Suche nach solchen Immunmodulatoren gewann man schnell die Erkenntnis, dass viele dieser autoimmunen Inflamationsprozesse direkt oder indirekt auf der proteasomalen Aktivität beruhen. Die Regulation der Aktivität von NF κ B ist ein solcher Prozess. Die anti-inflammatorische Aktivität von proteasomalen Inhibitoren ist bereits in verschiedenen Tiermodellen beschrieben worden, wobei eine signifikante Korrelation zur Inhibition der NF κ B-Aktivierung bekannt ist [154, 155] . Wegen seiner anti-inflammatorischen Wirkung in

anderen Erkrankungen testeten Ahtoniemi et al. (2007) die Wirkung von oral verabreichtem Pyrrolidin-Dithiocarbamaten (PDTC) auf ALS in G93A Superoxid Dismutase (SOD) 1 transgenen Ratten [126]. Eine Behandlung mit PDTC führte zu einer signifikanten Reduktion der Lebensspanne. Es erfolgte eine Zunahme an ubiquitinierten Substraten und eine Abnahme der proteasomalen Aktivität im Rückenmark. Mittels Immunocytochemie konnte eine Reduktion an Immunproteasomen in Gliazellen nachgewiesen werden. Ahtoniemi et al. stellten die Theorie auf, das PDTC als Proteasom-Inhibitor fungiert und das Immunproteasom möglicherweise eine Schutzfunktion vor den negativen Auswirkungen der SOD1 Mutation in neuronalen Zellen ausübt.

Die Generierung von MHC-Klasse-I Liganden (bei MS von Selbstepitopen) steht überwiegend unter proteasomaler Kontrolle. Der C-Terminus für MHC-Klasse-I Epitope wird fast ausschließlich durch das Proteasomensystem generiert [156, 157]. Die Tatsache, dass die Mehrheit der im ZNS gefundenen T-Lymphozyten bei MS Patienten CD8⁺ sind [86], legen eine Beteiligung des Proteasoms an der Entstehung der MS bzw. EAE nahe.

Mit der Identifizierung des enzephalitogenen Epitops in MOG35-55 haben sich schon mehrere Gruppen befasst. Dabei wurde sowohl nach MHC-Klasse-I als auch MHC-Klasse-II Epitopen gesucht. Danach liegt die Kernsequenz für das MHC-Klasse-II Epitop im Bereich MOG 40-48 [79, 82, 83]. Klassische MHC-Klasse-II Epitope haben jedoch eine Länge von 12-19 Aminosäuren [158], womit dieses Nona-Peptid eher die Länge eines MHC-Klasse-I Liganden besitzt (9-12 Aminosäuren).

Sun et al. (2001) konnten zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen spezifisch für MOG35-55 in der Lage waren, EAE in WT BL6 Mäusen auszulösen, nicht jedoch in β 2-Mikroglubulin-defizienten Mäusen [80]. In einer späteren Arbeit identifizierten Sun et al. (2003) die Bereiche MOG40-54 und MOG44-54 als enzephalitogene Epitope für CD8⁺ Zellen [84]. Dabei hat das verkürzte Peptid einen Teil seiner EAE auslösenden Eigenschaft verloren. Die Tatsache, dass MOG40-54 den potentiellen MHC-Klasse-II Liganden MOG 40-48 enthält, dieses Nonapeptid aber die übliche Länge eines MHC-Klasse-I Liganden besitzt und es sich nach Analyse mit einem Proteasom-Schnitt- und MHC-Klasse-I Bindungsprogramm (MAPPP MHC-I binding prediction) dabei um ein H-2D^b Liganden handelt, führte dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit MOG40-48 in die Analyse des Schnittverhaltens der Proteasomen mit aufgenommen wurde. Es wird im Folgenden als Epitop 2 bezeichnet.

Ford und Evavold (2005) identifizierten in ihren Studien MOG37-46 als das minimale CD8⁺ T-Zell stimulierende Epitop. Obwohl es nur eine geringe Affinität für H-2D^b besitzt, stimuliert es *in vitro* die INF γ Produktion von MOG spezifischen CD8⁺ Zellen und ist *in vivo* in der Lage EAE auszulösen. Außerdem gelang es ihnen zu zeigen, dass das MOG Epitop mittels H-2D^b präsentiert wird. Als anderen H-2D^b Liganden identifizierten sie das Peptid MOG42-50, das bessere MHC stabilisierende Eigenschaften besitzt, aber nicht in der Lage war, eine INF γ Produktion bei MOG 35-55 spezifischen T-Zellen auszulösen. Bei Applikation von MOG42-50 konnte mit einer Inzidenz von 50% nur eine schwache EAE ausgelöst werden (mittlerer Score-Wert 1,2). Ebenfalls gute MHC-Klasse-I stabilisierende und EAE auslösende Eigenschaften besitzt MOG37-50. Der MHC Tetramer-Komplex von MOG37-50/H-2D^b konnte in CD8⁺ T-Zellen (extrahiert aus dem Gehirn EAE erkrankter Mäuse) mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Daten wurde bei der Epitopgenerierung durch das Proteasom nach den Fragmenten MOG 37-46 (Epitop 1) [85] und MOG 40-48 (Epitop 2) [82, 83] gesucht. Eine Sequenzanalyse ergab zusätzlich als wahrscheinlichstes potentiell Epitop das Fragment MOG42-50 (Epitop 3).

Bei der Analyse der proteasomal erzeugten Peptidfragmente von MOG29-62 konnte keine Schnittstelle gefunden werden, die spezifisch für die Proteasomen mit erhöhter trypsin-ähnlicher Aktivität ist. Die ermittelten Fragmente wurden in allen Tier-Gruppen (Kontrolle, OVA früh, OVA spät, MOG früh, MOG spät) gefunden oder in nur einem von zwei Experimenten. Jedoch besaßen die Proteasomen isoliert aus den prospektiv erkrankten Tieren einen deutlich langsameren Substratumsatz, generierten aber etwa gleiche Mengen an Epitop 2 und des um zwei Aminosäuren verlängerten Präkursors (Abb. 27-29). Nach 12 Stunden Verdauzeit haben die Proteasomen der „MOG früh“-Tiere im Vergleich zu den anderen Proteasomen etwa gleich viel dieser zwei Fragmente (Y[12-20]V und G[10-20]V) gebildet, bei nur einem Drittel der benötigten Substratmenge im Vergleich zu den anderen Proteasomen (Abb. 29). Die Schnitte nach den Aminosäuren Valin (an Position 9 und 20) und Tryptophan (an Position 11) scheinen somit dreimal häufiger zu erfolgen als bei den anderen Proteasomen.

Im Gegensatz zu Epitop 2 wird Epitop 1 von Proteasomen aus prospektiv erkrankten Mäusen („MOG früh“) kaum generiert (Abb. 27-29). Für den Vorläufer von Epitop 1 (G[1-18]R) ist das Ergebnis nicht eindeutig, das Fragment wurde in den zwei durchgeführten Experimenten

unterschiedlich gut gebildet. Eine gesicherte Aussage über seine Generierung ist daher nicht möglich.

Auch die Bildung von Epitop 3 war in den zwei Prozessierungsexperimenten unterschiedlich, so dass ein Vergleich bezüglich der Effektivität der Bildung nur schwer möglich ist. Allerdings besitzt Epitop 3 ein Prolin an zweiter Position des N-Terminus, so dass ein effizienter TAP („Transporter associated with Antigen Processing“) Transport voraussichtlich nicht erfolgt [111, 112, 159]. Es ist daher anzunehmen, dass Vorläufer des Epitopes in das ER transportiert werden, wo sie von Peptidasen auf die bevorzugte Länge von 8-10 Aminosäuren für MHC-Klasse-I Peptide gekürzt werden. Betrachtet man die Bildung der Präkursoren, so werden diese relative gleich gut von allen Proteasomen gebildet. Dies bedeutet eine effizientere Generierung der Vorläufer des Epitops 3 durch die Proteasomen isoliert aus den MOG Tieren ohne Symptome („MOG früh“), da diese nur die Hälfte bis ein Drittel der Substratmenge in Vergleich zu den anderen Proteasomen zur Generierung der nahezu gleichen Mengen benötigten. Das Proteasom der „MOG früh“-Tiere ist nach 12 Stunden Verdauzeit zwei- bis dreimal effizienter in der Generierung der Präkursoren von Epitop 3 als die anderen Proteasomen.

Des weiteren fällt auf, dass die Proteasomen isoliert aus den „MOG früh“-Tieren offensichtlich einen Schnitt nach den Aminosäuren 9 (Valin) und 11 (Tryptophan) des Substrates präferieren, da sie deutlich mehr Fragmente G[1-9]V und G[1-11]W im Vergleich zu den anderen Proteasomen generieren (Abb. 27-29). Für die Effizienz der Spaltreaktion am C-Terminus spielt die Sequenzumgebung der C-terminalen Aminosäure (P1) eine entscheidende Rolle. Kleine Aminosäuren wie Glycin und Alanin an der C-terminal flankierenden Position (P1') unterstützen die Spaltung [10, 160]. Für das Fragment G[1-9]V ist Glycin die Aminosäure an Position P1', was eine Spaltreaktion begünstigen würde, für G[1-11]W befindet sich mit Tyrosin eine größere Aminosäure mit unpolarer Seitenkette an Position P1'. Aber nicht nur die Aminosäuren an Position P1 und P1' beeinflussen die Effizienz einer Spaltung, auch Aminosäuren innerhalb des Peptides sowie Peptid-flankierende Sequenzen [10, 161, 162, 163, 164]. Vielleicht liegt in dieser Aminosäureabfolge der Grund, warum an Position 11 das Substrat so häufig gespalten wird.

Die Bildung der zwei Fragmente (G[1-9]V und G[1-11]W) führt zu einer Zerstörung des Epitops 1 (V[9-18]R), was eine Erklärung für die geringe Bildung dieses Epitops darstellen kann. Zusätzlich führen diese beiden Schnitte zu Bildung der N-Termini des Epitops 2 und seines um zwei Aminosäuren längeren Vorläufers (G[10-20]V), sowie zur Bildung der N-

Termini von zwei Präkursoren des Epitops 3. Gebildet werden die N-Termini des um zwei bzw. vier Aminosäuren verlängerten Epitops 3 (G[10-22]L und Y[12-22]L).

In der Maus existieren bis zu drei verschiedene MHC-Klasse-I Typen, die Histokompatibilität-2 (H-2) Moleküle. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten C57BL/6 Mäuse besitzen den Haplotyp b und demzufolge die MHC-Klasse-I Moleküle H-2D^b und H-2K^b. Auf Grund eines Defektes in der α -Kette kommt das MHC-Klasse-I Moleküle H-2L^b bei diesen Mäusen nicht vor. MHC-Klasse-I bindende Peptide sind durchschnittlich 8-10 Aminosäuren lang [165]. Für die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül sind jedoch nur wenige Aminosäuren des Peptids verantwortlich. Die von einem MHC-Klasse-I Molekül bevorzugten Peptide besitzen an zwei oder drei spezifischen Positionen dieselben bzw. ähnliche Aminosäuren, so genannte Ankerreste. Die hochpolymorphen MHC-Klasse-I Haplotypen unterscheiden sich darin, welche Aminosäuren sie an welcher Position des Peptides für eine Bindung bevorzugen. Bei dem H-2D^b MHC-Klasse-I Molekül der Maus sind die Ankerreste an Position fünf Asparagin und an Position neun Methionin (Abb. 30) [165, 166]. Da die restliche Peptidsequenz nur wenig Einfluss auf die Bindung ausübt, kann jedes MHC-Klasse-I Molekül eine Vielzahl von Epitopen präsentieren [165].

Bei dem von den Proteasomen aus den MOG Tieren zum frühen Zeitpunkt der EAE bevorzugt generierten Epitop 2 handelt es sich nach Angaben der Vorhersageprogramme um einen H-2D^b Liganden bzw. nach Literaturangaben um einen potentiellen Bereich für einen MHC-Klasse-II Liganden. Die MHC-Klasse-I Bindung dieses potentiellen Epitopes muss noch untersucht werden. Ein Vergleich der Sequenz des Epitopes mit den dominanten Ankerresten der Bindungsfurche für das H-2D^b MHC-Klasse-I Moleküls zeigt keine Übereinstimmung in den Aminosäurepositionen (Abb. 30).

Die C-terminale Aminosäure (Valin) ist jedoch ebenfalls hydrophob und in ihrer Struktur dem Isoleucin, einer starken Ankeraminosäure, sehr ähnlich. Mit Ausnahme des Serins an Position 6 im Epitop zeigt keine weitere Aminosäure eine Übereinstimmung mit dem Bindungsmotiv. Die Aminosäure Serin ist eine schwache Ankeraminosäure. Der Sequenzvergleich lässt die Vermutung zu, dass Epitop 2 kein sehr guter H-2D^b Ligand ist.

Die durch das Proteasomensystem gebildeten C-Termini mit hydrophoben oder basischen Aminosäuren [167] entsprechen neben den Bindungsrestriktionen der MHC-Klasse-I Moleküle auch denen des TAP. Der TAP transportiert bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8-12 Aminosäuren, aber auch Peptide mit bis zu 16 Aminosäuren können Transportsubstrate

darstellen [113, 114] . Der Präkursor für Epitep 2 hat mit einer Länge von 11 Aminosäuren eine optimale Länge für den Transportvorgang. Vielleicht können eine effiziente Generierung und ein guter Transport die schlechten Bindungsqualitäten des Epitepes ausgleichen. Wenn sehr viel von diesem Epitep generiert wird, kann vielleicht auch eine kurze Präsentation auf der Zelloberfläche eine Autoimmunreaktion auslösen. Zudem zeigten Ford und Evavold (2005) in ihren Studien zur Identifizierung des minimalen CD8+ T-Zell stimulierenden MOG-Epiteps, dass trotz geringer Affinität für H-2D^b das Fragment MOG 37-46 (in der vorliegenden Arbeit als Epitep 1 bezeichnet) *in vivo* in der Lage ist EAE auszulösen. Befunde aus *in vitro* Versuchen müssen also nicht unbedingt die *in vivo* Situation widerspiegeln.

Das von Ford und Evavold [85] postulierte Epitep MOG 37-46 (Epitep 1) wurde von den Proteasomen mit erhöhter trypsin-ähnlicher Aktivität in diesen Untersuchungen kaum gebildet.

Aufgrund von abweichenden Ergebnissen in den zwei Prozessierungsexperimenten lässt sich keine gesicherte Aussage zur Generierung von Epitep 3 machen. Da es ein Prolin an zweiter Position des N-Terminus trägt, wird es vermutlich nicht vom TAP in das ER transportiert und muss als Präkursor generiert werden. Bisher ist noch nicht genau verstanden, was die Spaltung an der N-terminalen Seite eines Epiteps bestimmt. Diese Spaltung scheint weniger strikt durch das Proteasom zu erfolgen [168] . In einigen Fällen kann die N-terminale Sequenz des proteasomal generierten Peptids gegenüber der des MHC-Klasse-I-bindenden Epiteps um einige Aminosäuren verlängert sein, man spricht dann von der Bildung eines Präkursors / Vorläufers. Die Generierung eines verlängerten Epitepes scheint immer dann notwendig zu sein, wenn ein Epitep N-terminale Aminosäuren aufweist, die den effizienten TAP Transport verhindern, wie z.B. Prolin in Position 1, 2 oder 3 [111, 112] . Durch die N-terminale Verlängerung werden die negativen Bindungseigenschaften vermutlich aufgehoben, so dass ein TAP Transport dennoch erfolgen kann. Diese Tatsache wurde für ein virales immundominantes Epitep aus MCMV pp89 von Knühl et al. (2001) gezeigt. Ausschließlich der Präkursor konnte effizient von TAP transportiert werden. Im ER erfolgte dann die Bildung des tatsächlichen Epiteps [169] . In der vorliegenden Arbeit besitzt das Epitep 3 ein Prolin an zweiter Position des N-Terminus, so dass auch hier vermutlich nur ein Präkursor des Epitepes in das ER und somit zum MHC-Klasse-I Molekül gelangt.

H-2D^b Ankerpositionen									
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dominant					N				M
Stark		M	I	K		L			I
			L	E		F			
			P	Q					
			V	V					
Schwach			G	D					
	A	A		T		A	D	F	L
	N	Q				Y	E	H	
	I	D				T	Q	K	
	F					V	V	S	
	P					M	T	Y	
	S					E			
	T					Q			
	V					H			
						I			
						K			
						P			
						S			
Epitop 1	V	G	W	Y	R	S	P	F	S
Epitop 2		Y	R	S	P	F	S	R	V
PrecEp2 10-20	GW	Y	R	S	P	F	S	R	V
Epitop 3		S	P	F	S	R	V	V	H
PrecEp3 10-22	GWYR	S	P	F	S	R	V	V	H
PrecEp3 12-22	YR	S	P	F	S	R	V	V	H

Abb. 30: MHC-Klasse-I Ankerpositionen für den Haplotypen H-2Db und die Sequenzen der Epitope 1, 2 und 3 und ausgewählter Präkursoren. (entnommen Falk 1991 und verändert)

Bei der Generierung der Vorläufer des Epitops 3 sind die Proteasomen, die aus den MOG Tieren ohne Symptome („MOG früh“) isoliert wurden, erneut effizienter als die anderen Proteasomen. Das Leucin am C-Terminus, das davor liegende Histidin sowie die beiden Valine und das Serin am N-Terminus sind alles schwache Ankeramino-säuren (Abb. 30). Das Epitop könnte also schwache MHC-Klasse-I Bindungseigenschaften besitzen. In den Versuchen von Ford und Evavold zeigte es eine schwache EAE auslösende Funktion [85] und besitzt vielleicht deshalb für die Entstehung der EAE eine eher untergeordnete Funktion.

Trotz ähnlicher Veränderung der trypsin-ähnlichen Aktivität der 20S Proteasomen im Test mit fluorogenen Peptidsubstraten von „MOG früh“ Tieren und den OVA Tieren zum späten Zeitpunkt (Abb. 19) war ein deutlich unterschiedliches Verhalten dieser beiden Proteasomen in den Prozessierungsexperimenten mit MOG29-62 zu beobachten. Während sich das aus den OVA Tieren isolierte Proteasom wie die Proteasomen aus den anderen untersuchten Tier-Gruppen (Kontrolle, OVA früh, MOG spät) verhielt, zeigte das Proteasom aus den MOG Tieren zum frühen Zeitpunkt der EAE eine signifikant langsamere Abbaurate von MOG29-62. Obwohl qualitativ kein verändertes Schnittmuster gefunden werden konnte, war die

Generierung von Epitope 1 (MOG37-46) von den Proteasomen aus MOG-Tieren ohne Symptome („MOG früh“) signifikant geringer als bei den anderen Proteasomen. Dies erklärt sich vor allem durch die hohe Schnittpräferenz nach den Aminosäuren an Position 9 (Valin) und 11 (Tryptophan) des Substrates. Proteasomen isoliert aus dem Großhirn aus MOG-immunisierten Tieren zum frühen Zeitpunkt der EAE katalysierten eine verminderte Bildung des Epitops 1 zu Gunsten der Bildung des Epitops 2 und von Präkursoren des Epitops 2 und 3. Somit kann es möglicherweise leichter zu einer kritischen Menge eines oder beider Epitope kommen, dessen Präsentation eventuell zur Auslösung der EAE ausreicht.

Die Tatsache, dass die Proteasomen der „MOG früh“ Tiere erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität besitzen, würde eher vermuten lassen, dass sie bevorzugt die Generierung des Epitop 1 mit seinem C-terminalen Arginin 46 katalysieren bzw. den Schnitt nach basischen Aminosäuren bevorzugen. Die Beobachtung, dass eine erhöhte trypsin-ähnliche Aktivität vorliegt, wurde mit Tripeptiden mit einer C-terminal gebundenen chemischen Gruppe, die bei Abspaltung fluorogen wird, gewonnen. Dieses Substrat ähnelt in keiner Weise den *in vivo* Substraten des Proteasoms. Folglich ist es nicht unbedingt überraschend, dass beim Abbau von Peptidsubstraten, die eher den *in vivo* Bedingungen entsprechen, sich diese strikte Zuteilung von Schnittpräferenzen nicht aufrechterhalten lässt. Es wurde bereits in früheren detaillierten Untersuchungen zur Spaltspezifität von Proteasomen nachgewiesen, dass Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit fluorogenen Peptidsubstraten im Vergleich zu denen mit längeren Peptidsubstraten, bestehen [10, 11].

Worin der genaue Unterschied zwischen den einzelnen Proteasomen besteht kann nur vermutet werden. Ob eine Modifikation oder veränderte Konformation Ursache für die unterschiedliche Schnitteffektivität bzw. die veränderte Aktivität ist, konnte nicht geklärt werden, vor allen Dingen, weil die Mengen an Hirn-Proteasomen, die aus den verschiedenen Tier-Gruppen gereinigt werden konnten, zu gering waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Proteasom in Astrozyten untersucht. In primär isolierten Astrozyten wurden die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ detektiert, was vermutlich an den Isolationsbedingungen liegt. In der Astrozytenzelllinie TSA-3 konnte demonstriert werden, dass ruhende Astrozyten kein Immunproteasom besitzen, auf Stimulation jedoch mit dessen Bildung reagieren. Dass Astrozyten unter *in vivo* Bedingungen kein Immunproteasom besitzen, deckt sich mit den Ergebnissen aus den Isolationsexperimenten von Proteasomen aus dem Großhirn von Mäusen verschiedener Altersstufen, den Daten der mRNA-Expression,

sowie den Ergebnissen aus der Immunhistologie. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde unterstreichen die allgemeine Ansicht, dass das ZNS ein immunprivilegiertes Organ ist, denn selbst in den Bereichen des ZNS, in denen durch die EAE ausgelöste morphologische Läsionen zu erkennen sind, ist nur eine sehr moderate und streng begrenzte Veränderung des Proteasoms, nämlich eine Veränderung der trypsin-ähnlichen Aktivität, nachzuweisen.

Die aus dem Großhirn isolierten Proteasomen verändern im Verlauf der EAE-Erkrankung ihre Untereinheiten-Zusammensetzung nicht. Anscheinend reicht der Inflammationsstimulus nicht aus, um eine Induktion der Expression von Immunproteasomen auszulösen oder die Veränderung erfolgt zu einem anderen Zeitpunkt, als dem hier untersuchten. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass während einer EAE grundsätzlich kein Immunproteasom im Großhirn gebildet wird.

Dennoch erfolgt eine Veränderung im Proteasom der mit MOG injizierten Tiere vor dem Auftreten der ersten Symptome (MOG früh), die zu einem verlangsamten Substratabbau und einer effizienteren Epitopgenerierung führt. Dass Veränderungen des Proteasom-Systems vor dem Ausbruch der eigentlichen Erkrankung zu beobachten sind, ist bereits aus anderen Erkrankungen bekannt [118]. Inwieweit das Proteasom bzw. Immunproteasom bei der EAE eine Rolle spielt, muss in weiterführenden Studien noch genauer untersucht werden. Wie bereits unter 4.3 erläutert, existiert eine große Heterogenität in den EAE-Modellen, in denen die Rolle des Proteasoms in der EAE unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Negative Ergebnisse können somit unter anderem auf einem falsch gewählten Modell, einem zu frühen oder zu späten Zeitpunkt der Analyse oder einer zu schwach ausgeprägten EAE beruhen. Dass der Zeitpunkt einen wesentlichen Einfluss auf das beobachtete Ergebnis hat, stellten auch Hosseini et al. (2001) in ihren Untersuchungen fest. Hosseini et al. konnten zeigen, dass eine tägliche Verabreichung von Ritonavir an SJL Mäuse und Lewis Ratten zu einem Schutz vor EAE führt [155]. Die Verabreichung musste direkt nach Immunisierung erfolgen. Eine präventive Verabreichung bzw. nach dem Auftreten der Symptome führte zu keinem Schutz. Ritonavir wirkte inhibierend auf die chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms, aber aktivierend auf die trypsin-ähnliche Aktivität. Der entstehende Schutz war zeit- und dosisabhängig und wurde von einem Ausbleiben der Zellinfiltration ins ZNS begleitet.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Immunproteasombildung in Gehirnzellen zur Induktion bzw. dem Aufrechterhalten einer

EAE nicht notwendig ist. Zu einem ähnlichen Schluss kamen Frausto et al. (2007). In ihren Untersuchungen zeigten LMP2 knock-out Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen keine sichtbaren Unterschiede in Stärke oder Zeitpunkt des Auftretens der Symptome der EAE [170]. Frausto et al. postulierten, dass Immunproteasomen für die Induktion der EAE nicht von Bedeutung sind. Über eine ähnliche Argumentation kamen auch Puttaparthi et al. zu dem Ergebnis, dass ein vollständiges Immunproteasom nicht entscheidend für den Verlauf bzw. die Entwicklung der Amyotrophen Lateralsklerose ist [171]. Bei einem Vergleich von G93A SOD1 Mäusen mit G93A SOD1 LMP2^{-/-} Mäusen fanden Puttaparthi et al. eine Abnahme der proteasomalen Aktivität im Rückenmark aber keine Unterschiede in der Lebensspanne der Tiere oder der Stärke der Bewegungsstörungen. Dabei wurde nicht in Betracht gezogen, dass $\beta 5i$ /LMP7 üblicherweise als erste Untereinheit bei der Bildung des Immunproteasom

eingebaut wird. Die verstärkte Expression von $\beta 5i$ im Westernblot blieb von Puttaparthi et al. unkommentiert, da keine Abnahme von $\beta 5$ zu sehen war. Die Frage bleibt offen, ob der fehlende Effekt darauf beruht, dass $\beta 1i$ /LMP2 und $\beta 5i$ /LMP7 unterschiedliche Funktionen in Bezug auf die Erkrankung haben und $\beta 1i$ / LMP2 nicht die entscheidende Aktivität trägt.

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten konnte auf Proteinebene kein Immunproteasom im Großhirn der EAE erkrankten Tieren gefunden werden, mit Ausnahme schwacher Signale in den immunhistologischen Untersuchungen. Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei der EAE um eine autoimmune Erkrankung handelt, lassen die erarbeiteten Ergebnisse den Schluss zu, dass Standardproteasomen in der Lage sind, das immunogene Epitop aus MOG zu generieren, um es den infiltrierenden Immunzellen zu präsentieren und dadurch eine EAE zu induzieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Nair, A.; Frederick, T. J. und Miller, S. D. (2008): Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment, *Cell Mol Life Sci* (Band 65), Nr. 17, Seite 2702-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18516496
- [2] Glickman, M. H. und Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* (Band 82), Nr. 2, Seite 373-428. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11917093
- [3] Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 2), Nr. 3, Seite 179-87. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11265247
- [4] Rock, K. L.; York, I. A.; Saric, T. und Goldberg, A. L. (2002): Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Adv Immunol* (Band 80), Seite 1-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12078479
- [5] Kloetzel, P. M. (2004): The proteasome and MHC class I antigen processing, *Biochim Biophys Acta* (Band 1695), Nr. 1-3, Seite 225-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15571818
- [6] Dahlmann, B. (2005): Proteasomes, *Essays Biochem* (Band 41), Seite 31-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16250896
- [7] Dahlmann, B.; Kuehn, L.; Rutschmann, M. und Reinauer, H. (1985): Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle, *Biochem J* (Band 228), Nr. 1, Seite 161-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3890839
- [8] Wilk, S. und Orlowski, M. (1983): Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex, *J Neurochem* (Band 40), Nr. 3, Seite 842-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6338156
- [9] Wilk, S. und Orlowski, M. (1980): Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme, *J Neurochem* (Band 35), Nr. 5, Seite 1172-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6778972
- [10] Nussbaum, A. K.; Dick, T. P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (1998): Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 21, Seite 12504-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9770515

-
- [11] Shimbara, N.; Nakajima, H.; Tanahashi, N.; Ogawa, K.; Niwa, S.; Uenaka, A.; Nakayama, E. und Tanaka, K. (1997): Double-cleavage production of the CTL epitope by proteasomes and PA28: role of the flanking region, *Genes Cells* (Band 2), Nr. 12, Seite 785-800. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9544705
- [12] Strehl, B.; Seifert, U.; Kruger, E.; Heink, S.; Kuckelkorn, U. und Kloetzel, P. M. (2005): Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing, *Immunol Rev* (Band 207), Seite 19-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16181324
- [13] Kruger, E.; Kuckelkorn, U.; Sijts, A. und Kloetzel, P. M. (2003): The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (Band 148), Seite 81-104. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12687403
- [14] Yi, J. J. und Ehlers, M. D. (2007): Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function, *Pharmacol Rev* (Band 59), Nr. 1, Seite 14-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17329546
- [15] van Tijn, P.; Hol, E. M.; van Leeuwen, F. W. und Fischer, D. F. (2008): The neuronal ubiquitin-proteasome system: murine models and their neurological phenotype, *Prog Neurobiol* (Band 85), Nr. 2, Seite 176-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18448229
- [16] Dahlmann, B. (2007): Role of proteasomes in disease, *BMC Biochem* (Band 8 Suppl 1), Seite S3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18047740
- [17] Hegde, A. N. und Upadhyaya, S. C. (2007): The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system, *Trends Neurosci* (Band 30), Nr. 11, Seite 587-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17950927
- [18] Akaishi, T.; Shiomi, T.; Sawada, H. und Yokosawa, H. (1996): Purification and properties of the 26S proteasome from the rat brain: evidence for its degradation of myelin basic protein in a ubiquitin-dependent manner, *Brain Res* (Band 722), Nr. 1-2, Seite 139-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8813359
- [19] Akaishi, T.; Sawada, H. und Yokosawa, H. (1996): Properties of 26S proteasome purified from rat skeletal muscles: comparison with those of 26S proteasome from the rat brain, *Biochem Mol Biol Int* (Band 39), Nr. 5, Seite 1017-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8866019
- [20] Noda, C.; Tanahashi, N.; Shimbara, N.; Hendil, K. B. und Tanaka, K. (2000): Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 277), Nr. 2, Seite 348-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11032729

-
- [21] Piccinini, M.; Mostert, M.; Croce, S.; Baldovino, S.; Papotti, M. und Rinaudo, M. T. (2003): Interferon-gamma-inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome, *J Neuroimmunol* (Band 135), Nr. 1-2, Seite 135-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12576233
- [22] Mishto, M.; Bellavista, E.; Santoro, A.; Stolzing, A.; Ligorio, C.; Nacmias, B.; Spazzafumo, L.; Chiappelli, M.; Licastro, F.; Sorbi, S.; Pession, A.; Ohm, T.; Grune, T. und Franceschi, C. (2006): Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains, *Neurobiol Aging* (Band 27), Nr. 1, Seite 54-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16298241
- [23] Gillardon, F.; Kloss, A.; Berg, M.; Neumann, M.; Mechtler, K.; Hengerer, B. und Dahlmann, B. (2007): The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity, *J Neurochem* (Band 101), Nr. 6, Seite 1483-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17286585
- [24] Diaz-Hernandez, M.; Hernandez, F.; Martin-Aparicio, E.; Gomez-Ramos, P.; Moran, M. A.; Castano, J. G.; Ferrer, I.; Avila, J. und Lucas, J. J. (2003): Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease, *J Neurosci* (Band 23), Nr. 37, Seite 11653-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14684867
- [25] Puttaparthi, K. und Elliott, J. L. (2005): Non-neuronal induction of immunoproteasome subunits in an ALS model: possible mediation by cytokines, *Exp Neurol* (Band 196), Nr. 2, Seite 441-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16242125
- [26] Nedergaard, M.; Ransom, B. und Goldman, S. A. (2003): New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain, *Trends Neurosci* (Band 26), Nr. 10, Seite 523-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522144
- [27] He, F. und Sun, Y. E. (2007): Glial cells more than support cells?, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 39), Nr. 4, Seite 661-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17141551
- [28] Ransom, B.; Behar, T. und Nedergaard, M. (2003): New roles for astrocytes (stars at last), *Trends Neurosci* (Band 26), Nr. 10, Seite 520-2. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522143
- [29] Benarroch, E. E. (2005): Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system, *Mayo Clin Proc* (Band 80), Nr. 10, Seite 1326-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16212146
- [30] Pellerin, L. (2005): How astrocytes feed hungry neurons, *Mol Neurobiol* (Band 32), Nr. 1, Seite 59-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16077184

-
- [31] Abbott, N. J.; Ronnback, L. und Hansson, E. (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nat Rev Neurosci* (Band 7), Nr. 1, Seite 41-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16371949
- [32] Kim, J. H.; Park, J. A.; Lee, S. W.; Kim, W. J.; Yu, Y. S. und Kim, K. W. (2006): Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface, *J Biochem Mol Biol* (Band 39), Nr. 4, Seite 339-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16889675
- [33] Slezak, M. und Pfrieder, F. W. (2003): New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis, *Trends Neurosci* (Band 26), Nr. 10, Seite 531-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522145
- [34] Evanko, D. S.; Zhang, Q.; Zorec, R. und Haydon, P. G. (2004): Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes, *Glia* (Band 47), Nr. 3, Seite 233-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15252812
- [35] Newman, E. A. (2003): New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission, *Trends Neurosci* (Band 26), Nr. 10, Seite 536-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522146
- [36] Volterra, A. und Meldolesi, J. (2005): Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues, *Nat Rev Neurosci* (Band 6), Nr. 8, Seite 626-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16025096
- [37] Ubink, R.; Calza, L. und Hokfelt, T. (2003): 'Neuro'-peptides in glia: focus on NPY and galanin, *Trends Neurosci* (Band 26), Nr. 11, Seite 604-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585600
- [38] Allen, N. J. und Barres, B. A. (2005): Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity, *Curr Opin Neurobiol* (Band 15), Nr. 5, Seite 542-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16144764
- [39] McPherson, S. W.; Heuss, N. D.; Roehrich, H. und Gregerson, D. S. (2006): Bystander killing of neurons by cytotoxic T cells specific for a glial antigen, *Glia* (Band 53), Nr. 5, Seite 457-66. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355370
- [40] Dong, Y. und Benveniste, E. N. (2001): Immune function of astrocytes, *Glia* (Band 36), Nr. 2, Seite 180-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11596126
- [41] Aschner, M. (1998): Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes, *Toxicol Lett* (Band 102-103), Seite 283-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10022267
- [42] Carpentier, P. A.; Begolka, W. S.; Olson, J. K.; Elhofy, A.; Karpus, W. J. und Miller, S. D. (2005): Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune

-
- stimuli, *Glia* (Band 49), Nr. 3, Seite 360-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15538753
- [43] Farina, C.; Aloisi, F. und Meinl, E. (2007): Astrocytes are active players in cerebral innate immunity, *Trends Immunol* (Band 28), Nr. 3, Seite 138-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17276138
- [44] Constantinescu, C. S.; Tani, M.; Ransohoff, R. M.; Wysocka, M.; Hilliard, B.; Fujioka, T.; Murphy, S.; Tighe, P. J.; Sarma, J. D.; Trinchieri, G. und Rostami, A. (2005): Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23, *J Neurochem* (Band 95), Nr. 2, Seite 331-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16086689
- [45] Aloisi, F.; Ria, F. und Adorini, L. (2000): Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes, *Immunol Today* (Band 21), Nr. 3, Seite 141-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10689302
- [46] Gresser, O.; Weber, E.; Hellwig, A.; Riese, S. und Regnier-Vigouroux, A. (2001): Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S, *Eur J Immunol* (Band 31), Nr. 6, Seite 1813-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11433378
- [47] Cornet, A.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Cambouris, C.; Avellana-Adalid, V.; Kosmatopoulos, K. und Liblau, R. S. (2000): Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation, *J Neuroimmunol* (Band 106), Nr. 1-2, Seite 69-77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10814784
- [48] Kort, J. J.; Kawamura, K.; Fugger, L.; Weissert, R. und Forsthuber, T. G. (2006): Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice, *J Neuroimmunol* (Band 173), Nr. 1-2, Seite 23-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16386804
- [49] Becher, B.; Bechmann, I. und Greter, M. (2006): Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain, *J Mol Med* (Band 84), Nr. 7, Seite 532-43. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16773356
- [50] Nikcevich, K. M.; Gordon, K. B.; Tan, L.; Hurst, S. D.; Kroepfl, J. F.; Gardinier, M.; Barrett, T. A. und Miller, S. D. (1997): IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells, *J Immunol* (Band 158), Nr. 2, Seite 614-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8992975
- [51] Trajkovic, V.; Vuckovic, O.; Stosic-Grujicic, S.; Miljkovic, D.; Popadic, D.; Markovic, M.; Bumbasirevic, V.; Backovic, A.; Cvetkovic, I.; Harhaji, L.; Ramic, Z. und Mostarica Stojkovic, M. (2004): Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity, *Glia* (Band 47), Nr. 2, Seite 168-79. URL:

-
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15185395
- [52] Gimenez, M. A.; Sim, J. E. und Russell, J. H. (2004): TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation, *J Neuroimmunol* (Band 151), Nr. 1-2, Seite 116-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15145610
- [53] Tanuma, N.; Sakuma, H.; Sasaki, A. und Matsumoto, Y. (2006): Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis, *Acta Neuropathol* (Band 112), Nr. 2, Seite 195-204. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16733654
- [54] Ambrosini, E. und Aloisi, F. (2004): Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system, *Neurochem Res* (Band 29), Nr. 5, Seite 1017-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15139300
- [55] Ambrosini, E.; Remoli, M. E.; Giacomini, E.; Rosicarelli, B.; Serafini, B.; Lande, R.; Aloisi, F. und Coccia, E. M. (2005): Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 64), Nr. 8, Seite 706-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16106219
- [56] Ubogu, E. E.; Cossoy, M. B. und Ransohoff, R. M. (2006): The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation, *Trends Pharmacol Sci* (Band 27), Nr. 1, Seite 48-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16310865
- [57] Meinl, E.; Aloisi, F.; Ertl, B.; Weber, F.; de Waal Malefyt, R.; Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (1994): Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells, *Brain* (Band 117 (Pt 6)), Seite 1323-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7820569
- [58] Piccinini, M.; Rinaudo, M. T.; Anselmino, A.; Ramondetti, C.; Buccinna, B.; Fiano, V.; Ghimentì, C. und Schiffer, D. (2005): Characterization of the 20S proteasome in human glioblastomas, *Anticancer Res* (Band 25), Nr. 5, Seite 3203-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16101128
- [59] Keegan, B. M. und Noseworthy, J. H. (2002): Multiple sclerosis, *Annu Rev Med* (Band 53), Seite 285-302. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11818475
- [60] Kornek, B. und Lassmann, H. (2003): Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts, *Brain Res Bull* (Band 61), Nr. 3, Seite 321-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12909302
- [61] Dittel, B. N. (2008): CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS, *Brain Behav Immun* (Band 22), Nr. 4, Seite 421-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18207698

-
- [62] Racke, M. K. (2008): The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies, *Curr Opin Neurol* (Band 21 Suppl 1), Seite S9-S18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18388801
- [63] Hemmer, B.; Nessler, S.; Zhou, D.; Kieseier, B. und Hartung, H. P. (2006): Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis, *Nat Clin Pract Neurol* (Band 2), Nr. 4, Seite 201-211. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16932551
- [64] Johnson, A. J.; Suidan, G. L.; McDole, J. und Pirko, I. (2007): The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology?, *Int Rev Neurobiol* (Band 79), Seite 73-97. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17531838
- [65] Chitnis, T. (2007): The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis, *Int Rev Neurobiol* (Band 79), Seite 43-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17531837
- [66] Hauser, S. L. und Oksenberg, J. R. (2006): The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration, *Neuron* (Band 52), Nr. 1, Seite 61-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17015227
- [67] Ercolini, A. M. und Miller, S. D. (2006): Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease, *J Immunol* (Band 176), Nr. 6, Seite 3293-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16517694
- [68] Gold, R.; Linington, C. und Lassmann, H. (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research, *Brain* (Band 129), Nr. Pt 8, Seite 1953-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16632554
- [69] Ludwin, S. K. (2006): The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 65), Nr. 4, Seite 305-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16691112
- [70] Steinman, L. und Zamvil, S. S. (2006): How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis, *Ann Neurol* (Band 60), Nr. 1, Seite 12-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16802293
- [71] Kuerten, S. und Angelov, D. N. (2008): Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57BL/6 mice - a step towards understanding the complexity of multiple sclerosis, *Ann Anat* (Band 190), Nr. 1, Seite 1-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18342137

-
- [72] Aghdami, N.; Gharibdoost, F. und Moazzeni, S. M. (2008): Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by antigen pulsed dendritic cells in the C57BL/6 mouse: influence of injection route, *Exp Anim* (Band 57), Nr. 1, Seite 45-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18256518
- [73] Siffrin, V.; Brandt, A. U.; Herz, J. und Zipp, F. (2007): New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation, *Adv Immunol* (Band 96), Seite 1-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17981203
- [74] Weiss, H. A.; Millward, J. M. und Owens, T. (2007): CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease, *J Neuroimmunol* (Band 191), Nr. 1-2, Seite 79-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17920696
- [75] Kojima, K.; Wekerle, H.; Lassmann, H.; Berger, T. und Linington, C. (1997): Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta, *J Neural Transm Suppl* (Band 49), Seite 43-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9266413
- [76] Storch, M. K.; Stefferl, A.; Brehm, U.; Weissert, R.; Wallstrom, E.; Kerschensteiner, M.; Olsson, T.; Linington, C. und Lassmann, H. (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology, *Brain Pathol* (Band 8), Nr. 4, Seite 681-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9804377
- [77] Mendel, I.; Kerlero de Rosbo, N. und Ben-Nun, A. (1995): A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells, *Eur J Immunol* (Band 25), Nr. 7, Seite 1951-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7621871
- [78] Slavin, A.; Ewing, C.; Liu, J.; Ichikawa, M.; Slavin, J. und Bernard, C. C. (1998): Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Autoimmunity* (Band 28), Nr. 2, Seite 109-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9771980
- [79] Ben-Nun, A.; Mendel, I.; Bakimer, R.; Fridkis-Hareli, M.; Teitelbaum, D.; Arnon, R.; Sela, M. und Kerlero de Rosbo, N. (1996): The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic: effect of copolymer 1 on MOG-induced disease, *J Neurol* (Band 243), Nr. 4 Suppl 1, Seite S14-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8965116
- [80] Sun, D.; Whitaker, J. N.; Huang, Z.; Liu, D.; Coleclough, C.; Wekerle, H. und Raine, C. S. (2001): Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice, *J Immunol* (Band 166), Nr. 12, Seite 7579-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11390514
- [81] Huseby, E. S.; Liggitt, D.; Brabb, T.; Schnabel, B.; Ohlen, C. und Goverman, J. (2001): A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple

- sclerosis, J Exp Med (Band 194), Nr. 5, Seite 669-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11535634
- [82] Mendel Kerlero de Rosbo, N. und Ben-Nun, A. (1996): Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice, Eur J Immunol (Band 26), Nr. 10, Seite 2470-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8898962
- [83] Sweenie, C. H.; Mackenzie, K. J.; Rone-Orugboh, A.; Liu, M. und Anderton, S. M. (2007): Distinct T cell recognition of naturally processed and cryptic epitopes within the immunodominant 35-55 region of myelin oligodendrocyte glycoprotein, J Neuroimmunol (Band 183), Nr. 1-2, Seite 7-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17157925
- [84] Sun, D.; Zhang, Y.; Wei, B.; Peiper, S. C.; Shao, H. und Kaplan, H. J. (2003): Encephalitogenic activity of truncated myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptides and their recognition by CD8+ MOG-specific T cells on oligomeric MHC class I molecules, Int Immunol (Band 15), Nr. 2, Seite 261-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12578856
- [85] Ford, M. L. und Evavold, B. D. (2005): Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis, Eur J Immunol (Band 35), Nr. 1, Seite 76-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15593305
- [86] Steinman, L. (2001): Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis, J Exp Med (Band 194), Nr. 5, Seite F27-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11535639
- [87] Friese, M. A. und Fugger, L. (2005): Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?, Brain (Band 128), Nr. Pt 8, Seite 1747-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15975943
- [88] Mars, L. T.; Bauer, J.; Gross, D. A.; Bucciarelli, F.; Firat, H.; Hudrisier, D.; Lemonnier, F.; Kosmatopoulos, K. und Liblau, R. S. (2007): CD8 T cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein-derived peptides in humanized HLA-A*0201-transgenic mice, J Immunol (Band 179), Nr. 8, Seite 5090-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17911594
- [89] Hoftberger, R.; Aboul-Enein, F.; Brueck, W.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Schmidbauer, M.; Jellinger, K. und Lassmann, H. (2004): Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions, Brain Pathol (Band 14), Nr. 1, Seite 43-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14997936
- [90] Koh, D. R.; Fung-Leung, W. P.; Ho, A.; Gray, D.; Acha-Orbea, H. und Mak, T. W. (1992): Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice, Science (Band 256), Nr. 5060, Seite 1210-3. URL:

-
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1589800
- [91] Montero, E.; Nussbaum, G.; Kaye, J. F.; Perez, R.; Lage, A.; Ben-Nun, A. und Cohen, I. R. (2004): Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies, *J Autoimmun* (Band 23), Nr. 1, Seite 1-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15236747
- [92] Abdul-Majid, K. B.; Wefer, J.; Stadelmann, C.; Stefferl, A.; Lassmann, H.; Olsson, T. und Harris, R. A. (2003): Comparing the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in CD4-/- and CD8-/- DBA/1 mice defines qualitative roles of different T cell subsets, *J Neuroimmunol* (Band 141), Nr. 1-2, Seite 10-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12965249
- [93] Bando, N.; Ogino, T.; Cho, H. S.; Hur, S. Y.; Shen, J.; Wang, X.; Kato, S.; Miyokawa, N.; Harabuchi, Y. und Ferrone, S. (2005): Development and characterization of human constitutive proteasome and immunoproteasome subunit-specific monoclonal antibodies, *Tissue Antigens* (Band 66), Nr. 3, Seite 185-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16101829
- [94] Jungblut, P. R. und Seifert, R. (1990): Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells, *J Biochem Biophys Methods* (Band 21), Nr. 1, Seite 47-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1698848
- [95] Klose, J. und Kobalz, U. (1995): Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis* (Band 16), Nr. 6, Seite 1034-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7498127
- [96] Kuckelkorn, U.; Ruppert, T.; Strehl, B.; Jungblut, P. R.; Zimny-Arndt, U.; Lamer, S.; Prinz, I.; Drung, I.; Kloetzel, P. M.; Kaufmann, S. H. und Steinhoff, U. (2002): Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity, *J Exp Med* (Band 195), Nr. 8, Seite 983-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11956289
- [97] Nussbaum, A. K.; Kuttler, C.; Hadeler, K. P.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (2001): PAPProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW, *Immunogenetics* (Band 53), Nr. 2, Seite 87-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11345595
- [98] Hakenberg, J.; Nussbaum, A. K.; Schild, H.; Rammensee, H. G.; Kuttler, C.; Holzthutter, H. G.; Kloetzel, P. M.; Kaufmann, S. H. und Mollenkopf, H. J. (2003): MAPPP: MHC class I antigenic peptide processing prediction, *Appl Bioinformatics* (Band 2), Nr. 3, Seite 155-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15130801
- [99] Tenzer, S.; Peters, B.; Bulik, S.; Schoor, O.; Lemmel, C.; Schatz, M. M.; Kloetzel, P. M.; Rammensee, H. G.; Schild, H. und Holzthutter, H. G. (2005): Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and

-
- MHC class I binding, *Cell Mol Life Sci* (Band 62), Nr. 9, Seite 1025-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15868101
- [100] Stohwasser, R.; Giesebrecht, J.; Kraft, R.; Muller, E. C.; Hausler, K. G.; Kettenmann, H.; Hanisch, U. K. und Kloetzel, P. M. (2000): Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide, *Glia* (Band 29), Nr. 4, Seite 355-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10652445
- [101] Husom, A. D.; Peters, E. A.; Kolling, E. A.; Fugere, N. A.; Thompson, L. V. und Ferrington, D. A. (2004): Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle, *Arch Biochem Biophys* (Band 421), Nr. 1, Seite 67-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14678786
- [102] Ferrington, D. A.; Husom, A. D. und Thompson, L. V. (2005): Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle, *Faseb J* (Band 19), Nr. 6, Seite 644-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15677694
- [103] Stratford, F. L.; Chondrogianni, N.; Trougakos, I. P.; Gonos, E. S. und Rivett, A. J. (2006): Proteasome response to interferon-gamma is altered in senescent human fibroblasts, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 16, Seite 3989-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16806194
- [104] Bellavista, E.; Mishto, M.; Santoro, A.; Bertoni-Freddari, C.; Sessions, R. B. und Franceschi, C. (2008): Immunoproteasome in *Macaca fascicularis*: no age-dependent modification of abundance and activity in the brain and insight into an in silico structural model, *Rejuvenation Res* (Band 11), Nr. 1, Seite 73-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17985946
- [105] Gaczynska, M.; Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1993): Role of proteasomes in antigen presentation, *Enzyme Protein* (Band 47), Nr. 4-6, Seite 354-69. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7697133
- [106] Groettrup, M.; Standera, S.; Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 17, Seite 8970-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9256419
- [107] Klare, N.; Seeger, M.; Janek, K.; Jungblut, P. R. und Dahlmann, B. (2007): Intermediate-type 20 S Proteasomes in HeLa Cells: "Asymmetric" Subunit Composition, Diversity and Adaptation, *J Mol Biol* (Band 373), Nr. 1, Seite 1-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17804016
- [108] Zoeger, A.; Blau, M.; Egerer, K.; Feist, E. und Dahlmann, B. (2006): Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells, *Clin Chem* (Band 52), Nr. 11, Seite 2079-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16990418

-
- [109] Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. und Kuehn, L. (2001): Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle, *Biochimie* (Band 83), Nr. 3-4, Seite 295-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11295489
- [110] Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kuehn, L.; Merforth, S. und Kloetzel, P. M. (2000): Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties, *J Mol Biol* (Band 303), Nr. 5, Seite 643-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11061965
- [111] Neefjes, J.; Gottfried, E.; Roelse, J.; Gromme, M.; Obst, R.; Hammerling, G. J. und Momburg, F. (1995): Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters, *Eur J Immunol* (Band 25), Nr. 4, Seite 1133-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7737286
- [112] van Endert, P. M.; Riganelli, D.; Greco, G.; Fleischhauer, K.; Sidney, J.; Sette, A. und Bach, J. F. (1995): The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing, *J Exp Med* (Band 182), Nr. 6, Seite 1883-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7500034
- [113] Peters, B.; Bulik, S.; Tampe, R.; Van Endert, P. M. und Holzhutter, H. G. (2003): Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors, *J Immunol* (Band 171), Nr. 4, Seite 1741-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12902473
- [114] van Endert, P. M.; Tampe, R.; Meyer, T. H.; Tisch, R.; Bach, J. F. und McDevitt, H. O. (1994): A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing, *Immunity* (Band 1), Nr. 6, Seite 491-500. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7895159
- [115] Ding, Q. und Keller, J. N. (2001): Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system, *Free Radic Biol Med* (Band 31), Nr. 5, Seite 574-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11522442
- [116] Neumann, H.; Medana, I. M.; Bauer, J. und Lassmann, H. (2002): Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases, *Trends Neurosci* (Band 25), Nr. 6, Seite 313-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12086750
- [117] Piccinini, M.; Tazartes, O.; Mostert, M.; Musso, A.; DeMarchi, M. und Rinaudo, M. T. (2000): Structural and functional characterization of 20S and 26S proteasomes from bovine brain, *Brain Res Mol Brain Res* (Band 76), Nr. 1, Seite 103-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10719220
- [118] Shin, E. C.; Seifert, U.; Kato, T.; Rice, C. M.; Feinstone, S. M.; Kloetzel, P. M. und Rehmann, B. (2006): Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection, *J Clin Invest* (Band 116), Nr. 11, Seite 3006-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17039255
- [119] Heink, S.; Ludwig, D.; Kloetzel, P. M. und Kruger, E. (2005): IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response,

-
- Proc Natl Acad Sci U S A (Band 102), Nr. 26, Seite 9241-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15944226
- [120] Ding, Q.; Dimayuga, E. und Keller, J. N. (2006): Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS, *Antioxid Redox Signal* (Band 8), Nr. 1-2, Seite 163-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16487050
- [121] Strehl, B. K. (2005): Struktur und Funktion des 20S Proteasomen aus Organen Listeria monocytogenes infizierter Mäuse, Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- [122] Khan, S.; van den Broek, M.; Schwarz, K.; de Giuli, R.; Diener, P. A. und Groettrup, M. (2001): Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver, *J Immunol* (Band 167), Nr. 12, Seite 6859-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739503
- [123] Barton, L. F.; Cruz, M.; Rangwala, R.; Deepe, G. S., Jr. und Monaco, J. J. (2002): Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection, *J Immunol* (Band 169), Nr. 6, Seite 3046-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12218120
- [124] Macagno, A.; Kuehn, L.; de Giuli, R. und Groettrup, M. (2001): Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation, *Eur J Immunol* (Band 31), Nr. 11, Seite 3271-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11745344
- [125] Sijts, A. J.; Standera, S.; Toes, R. E.; Ruppert, T.; Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; Ossendorp, F. A.; Melief, C. J. und Kloetzel, P. M. (2000): MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells, *J Immunol* (Band 164), Nr. 9, Seite 4500-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779750
- [126] Ahtoniemi, T.; Goldsteins, G.; Keksa-Goldsteine, V.; Malm, T.; Kanninen, K.; Salminen, A. und Koistinaho, J. (2007): Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of immunoproteasome and decreases survival in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis, *Mol Pharmacol* (Band 71), Nr. 1, Seite 30-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17008387
- [127] Hayashi, T. und Goto, S. (1998): Age-related changes in the 20S and 26S proteasome activities in the liver of male F344 rats, *Mech Ageing Dev* (Band 102), Nr. 1, Seite 55-66. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9663792
- [128] Bulteau, A. L.; Szweda, L. I. und Friguet, B. (2002): Age-dependent declines in proteasome activity in the heart, *Arch Biochem Biophys* (Band 397), Nr. 2, Seite 298-304. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11795886

-
- [129] Bulteau, A. L.; Petropoulos, I. und Friguet, B. (2000): Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis, *Exp Gerontol* (Band 35), Nr. 6-7, Seite 767-77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11053667
- [130] Keller, J. N.; Gee, J. und Ding, Q. (2002): The proteasome in brain aging, *Ageing Res Rev* (Band 1), Nr. 2, Seite 279-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12039443
- [131] Keller, J. N.; Huang, F. F. und Markesbery, W. R. (2000): Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord, *Neuroscience* (Band 98), Nr. 1, Seite 149-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10858621
- [132] Keller, J. N.; Hanni, K. B. und Markesbery, W. R. (2000): Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress, *Mech Ageing Dev* (Band 113), Nr. 1, Seite 61-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10708250
- [133] Zeng, B. Y.; Medhurst, A. D.; Jackson, M.; Rose, S. und Jenner, P. (2005): Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age, *Mech Ageing Dev* (Band 126), Nr. 6-7, Seite 760-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15888331
- [134] Sitte, N.; Merker, K.; Von Zglinicki, T.; Grune, T. und Davies, K. J. (2000): Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence, *Faseb J* (Band 14), Nr. 15, Seite 2495-502. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11099467
- [135] Mishto, M.; Santoro, A.; Bellavista, E.; Bonafe, M.; Monti, D. und Franceschi, C. (2003): Immunoproteasomes and immunosenescence, *Ageing Res Rev* (Band 2), Nr. 4, Seite 419-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522244
- [136] Abd El Mohsen, M. M.; Irvani, M. M.; Spencer, J. P.; Rose, S.; Fahim, A. T.; Motawi, T. M.; Ismail, N. A. und Jenner, P. (2005): Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 336), Nr. 2, Seite 386-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16139799
- [137] Luo, J.; Ho, P. P.; Buckwalter, M. S.; Hsu, T.; Lee, L. Y.; Zhang, H.; Kim, D. K.; Kim, S. J.; Gambhir, S. S.; Steinman, L. und Wyss-Coray, T. (2007): Glia-dependent TGF-beta signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis, *J Clin Invest* (Band 117), Nr. 11, Seite 3306-15. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17965773
- [138] Brown, D. A. und Sawchenko, P. E. (2007): Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Comp Neurol* (Band 502), Nr. 2, Seite 236-60. URL:

-
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17348011
- [139] Costa, O.; Divoux, D.; Ischenko, A.; Tron, F. und Fontaine, M. (2003): Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55)peptide in C57BL/6/J strain of mice, *J Autoimmun* (Band 20), Nr. 1, Seite 51-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12604312
- [140] Kuerten, S.; Kostova-Bales, D. A.; Frenzel, L. P.; Tigno, J. T.; Tary-Lehmann, M.; Angelov, D. N. und Lehmann, P. V. (2007): MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum, *J Neuroimmunol* (Band 189), Nr. 1-2, Seite 31-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17655940
- [141] Kimura, Y.; Takaoka, M.; Tanaka, S.; Sassa, H.; Tanaka, K.; Polevoda, B.; Sherman, F. und Hirano, H. (2000): N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 7, Seite 4635-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10671491
- [142] Iwafune, Y.; Kawasaki, H. und Hirano, H. (2002): Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome, *Electrophoresis* (Band 23), Nr. 2, Seite 329-38. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11840541
- [143] Fernandez Murray, P.; Pardo, P. S.; Zelada, A. M. und Passeron, S. (2002): In vivo and in vitro phosphorylation of *Candida albicans* 20S proteasome, *Arch Biochem Biophys* (Band 404), Nr. 1, Seite 116-25. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12127076
- [144] Rexach, J. E.; Clark, P. M. und Hsieh-Wilson, L. C. (2008): Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain, *Nat Chem Biol* (Band 4), Nr. 2, Seite 97-106. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18202679
- [145] Marz, P.; Stetefeld, J.; Bendfeldt, K.; Nitsch, C.; Reinstein, J.; Shoeman, R. L.; Dimitriadis-Schmutz, B.; Schwager, M.; Leiser, D.; Ozcan, S.; Otten, U. und Ozbek, S. (2006): Ataxin-10 interacts with O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase in the brain, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 29, Seite 20263-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16714295
- [146] Sumegi, M.; Hunyadi-Gulyas, E.; Medzihradszky, K. F. und Udvardy, A. (2003): 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 312), Nr. 4, Seite 1284-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14652013
- [147] Wells, L.; Vosseller, K.; Cole, R. N.; Cronshaw, J. M.; Matunis, M. J. und Hart, G. W. (2002): Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications, *Mol Cell Proteomics* (Band 1), Nr. 10, Seite 791-804. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12438562

-
- [148] Zhang, F.; Su, K.; Yang, X.; Bowe, D. B.; Paterson, A. J. und Kudlow, J. E. (2003): O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome, *Cell* (Band 115), Nr. 6, Seite 715-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14675536
- [149] Klare, N. (2005): Strukturelle und biochemische Analyse der 20S Proteasom-Subtypen aus humanen Zellen, Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- [150] Seo, J. und Lee, K. J. (2004): Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches, *J Biochem Mol Biol* (Band 37), Nr. 1, Seite 35-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14761301
- [151] Okada, K.; Wangpoengtrakul, C.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Tanaka, K. und Uchida, K. (1999): 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 34, Seite 23787-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10446139
- [152] Mason, G. G.; Murray, R. Z.; Pappin, D. und Rivett, A. J. (1998): Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome, *FEBS Lett* (Band 430), Nr. 3, Seite 269-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9688553
- [153] Bulteau, A. L.; Lundberg, K. C.; Humphries, K. M.; Sadek, H. A.; Szweda, P. A.; Friguet, B. und Szweda, L. I. (2001): Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 32, Seite 30057-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11375979
- [154] Vanderlugt, C. L.; Rahbe, S. M.; Elliott, P. J.; Dal Canto, M. C. und Miller, S. D. (2000): Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519, *J Autoimmun* (Band 14), Nr. 3, Seite 205-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10756082
- [155] Hosseini, H.; Andre, P.; Lefevre, N.; Viala, L.; Walzer, T.; Peschanski, M. und Lotteau, V. (2001): Protection against experimental autoimmune encephalomyelitis by a proteasome modulator, *J Neuroimmunol* (Band 118), Nr. 2, Seite 233-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11498258
- [156] Seifert, U.; Maranon, C.; Shmueli, A.; Desoutter, J. F.; Wesoloski, L.; Janek, K.; Henklein, P.; Diescher, S.; Andrieu, M.; de la Salle, H.; Weinschenk, T.; Schild, H.; Laderach, D.; Galy, A.; Haas, G.; Kloetzel, P. M.; Reiss, Y. und Hosmalin, A. (2003): An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 4, Seite 375-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12598896
- [157] Kloetzel, P. M. (2004): Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 7, Seite 661-9. URL:

-
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15224091
- [158] Engelhard, V. H. (1994): Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules, *Annu Rev Immunol* (Band 12), Seite 181-207. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7516668
- [159] Neisig, A.; Roelse, J.; Sijts, A. J.; Ossendorp, F.; Feltkamp, M. C.; Kast, W. M.; Melief, C. J. und Neefjes, J. J. (1995): Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences, *J Immunol* (Band 154), Nr. 3, Seite 1273-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7822796
- [160] Del Val, M.; Schlicht, H. J.; Ruppert, T.; Reddehase, M. J. und Koszinowski, U. H. (1991): Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein, *Cell* (Band 66), Nr. 6, Seite 1145-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1913805
- [161] Kraft, R.; Kostka, S.; Grelle, G.; Henklein, P.; Kloetzel, P. M. und Kuckelhorn, U. (1998): Influence of single amino acid exchanges in epitope generation by 20S proteasome, *J Protein Chem* (Band 17), Nr. 6, Seite 547-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9723750
- [162] Shimbara, N.; Ogawa, K.; Hidaka, Y.; Nakajima, H.; Yamasaki, N.; Niwa, S.; Tanahashi, N. und Tanaka, K. (1998): Contribution of proline residue for efficient production of MHC class I ligands by proteasomes, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 36, Seite 23062-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9722532
- [163] Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; van Hall, T.; Neisig, A.; Sijts, A.; Camps, M.; Kloetzel, P. M.; Neefjes, J. J.; Melief, C. J. und Ossendorp, F. (2000): Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site, *J Immunol* (Band 164), Nr. 4, Seite 1898-905. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10657639
- [164] Eggers, M.; Boes-Fabian, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. und Koszinowski, U. H. (1995): The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides, *J Exp Med* (Band 182), Nr. 6, Seite 1865-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7500032
- [165] Rammensee, H. G.; Falk, K. und Rotzschke, O. (1993): Peptides naturally presented by MHC class I molecules, *Annu Rev Immunol* (Band 11), Seite 213-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8476560
- [166] Falk, K.; Rotzschke, O.; Stevanovic, S.; Jung, G. und Rammensee, H. G. (1991): Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules, *Nature* (Band 351), Nr. 6324, Seite 290-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1709722

-
- [167] Boes, B.; Hengel, H.; Ruppert, T.; Multhaup, G.; Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M. (1994): Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes, *J Exp Med* (Band 179), Nr. 3, Seite 901-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8113682
- [168] Schatz, M. M.; Peters, B.; Akkad, N.; Ullrich, N.; Martinez, A. N.; Carroll, O.; Bulik, S.; Rammensee, H. G.; van Endert, P.; Holzhutter, H. G.; Tenzer, S. und Schild, H. (2008): Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands, *J Immunol* (Band 180), Nr. 5, Seite 3210-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18292545
- [169] Goldberg, A. L.; Cascio, P.; Saric, T. und Rock, K. L. (2002): The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides, *Mol Immunol* (Band 39), Nr. 3-4, Seite 147-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12200047
- [170] Frausto, R. F.; Crocker, S. J.; Eam, B.; Whitmire, J. K. und Whitton, J. L. (2007): Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental allergic encephalomyelitis and T cell responses are unaffected by immunoproteasome deficiency, *J Neuroimmunol* (Band 192), Nr. 1-2, Seite 124-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17964666
- [171] Puttaparthi, K.; Van Kaer, L. und Elliott, J. L. (2007): Assessing the role of immunoproteasomes in a mouse model of familial ALS, *Exp Neurol* (Band 206), Nr. 1, Seite 53-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17482163

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMC	7-Amido-4-Methylcoumarin
APC	antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serum Albumin
B-Zellen	B-Lymphozyten
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CFA	Freund's complete adjuvant
Comassie BB	Coomassie Brilliant blue
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	„enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FCS	fötales Kälberserum
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
fw	<i>forward</i>
g	x-fache Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunden
H-2	Histokompatibilität-2
HPA	partielle Lähmung der Hinterläufe
HPL	Lähmung der Hinterläufe
IFN γ	Interferon γ
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	mol / L
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein

MP4	MBP-PLP Fusionsprotein
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
O-GlcNAc	Sauerstoff-gebundenes GlcNAc
OVA	Ovalbumin
PA	<i>proteasome activator</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PGPH	Peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolase
p.i.	post Infektion
PDTC	Pyrrolidine dithiocarbamate
PLP	Proteolipoprotein
PTX	pertussis toxin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RRW	gestörter Dreh-Reflex
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SOD	Superoxid Dismutase
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-p
ethylendi amin	
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TOF	„Time of Flight“
TPA	partielle Schwanzlähmung
TPL	vollständige Schwanzlähmung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
ü.N.	über Nacht
v/v	„Volume per Volume“
w/v	„Weight per Volume“
wt	wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Anhänge

Proteinidentifizierung mittels Peptidmassen-Fingerprint-Analyse und MSMS Auswertung

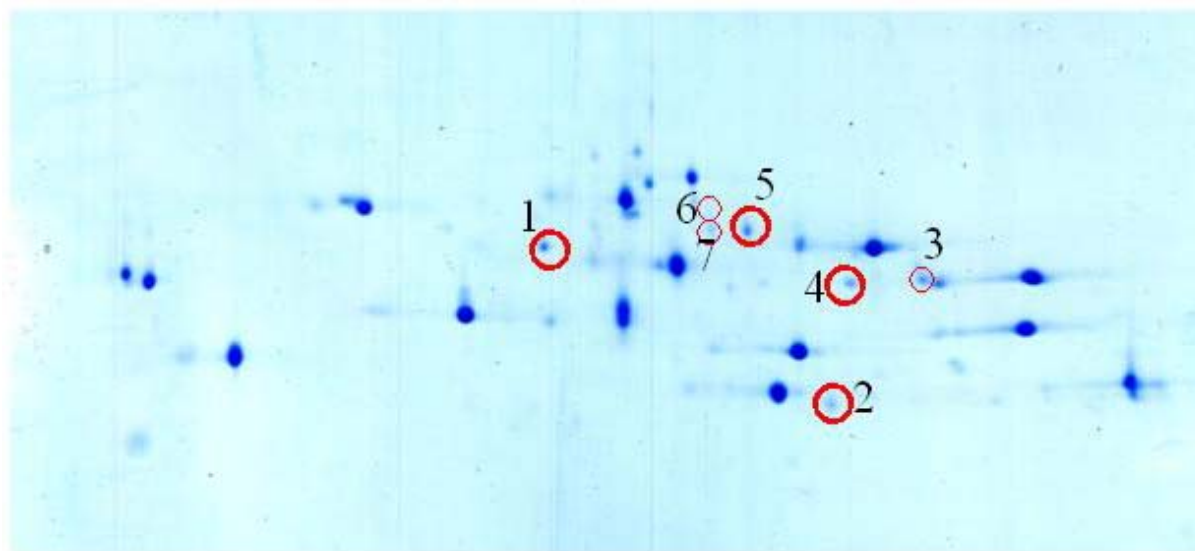


Abb. 31: Coomassie BB gefärbte 2D-PAGE von 20S Proteasom (40µg) isoliert aus primären Astrozyten. Massenspektrometrisch analysiert wurden die rot umrandeten Spots

Informationen aus den MS-Analysen der Proteinspots der 2D-PAGE von 20S

Proteasomen aus primären Astrozyten:

Sample Set Name: Siele_2DGele_0604xx

Analysis Name: SP_mammalia_50ppm / Proteas_DB_50ppm

Database: Swissprot

Spotset: 060425_platte10 / Run 7+8

Probe	Spot Label	Protein Name	UE	Peptide Count	Protein Score	Total Ion Score
1	D2	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	$\alpha 7$	11	317	237
2	D24	Proteasome subunit beta type 8 precursor (P28063)	$\beta 5i$	11	226	116
3	B6	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	8	216	155
	B10	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	6	190	144
4	B12	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	10	346	264
5	B16	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	6	229	168
6	nicht identifiziert					
7	nicht identifiziert					

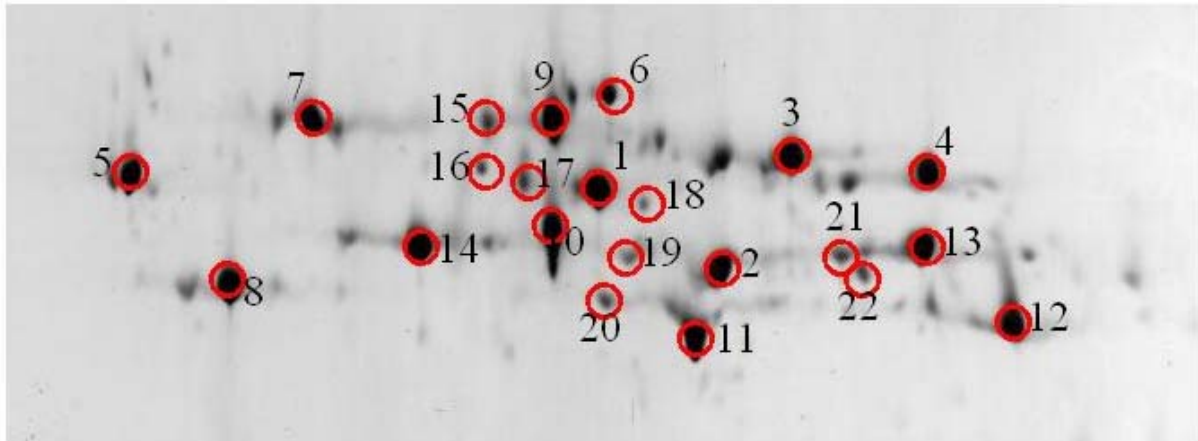


Abb. 32: Coomassie BB gefärbte 2D-PAGE von 20S Proteasomen (50µg) isoliert aus dem Großhirn von neugeborenen Mäusen. Massenspektrometrisch analysiert wurden die rot umrandeten Spots

Informationen aus den MS-Analysen der Proteinspots der 2D-PAGE von 20S Proteasomen aus dem Großhirn neugeborener Mäuse:

Sample Set Name: 080207_Platte4

Analysis Name: SP_50ppm_mouse_hirn_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080207_Platte4 run 5

Probe	Spot Label	Protein Name	UE	Peptide Count	Protein Score	Total Ion Score	Sequence Coverage
1	A3	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	α 1	14	373	263	58
2	A11	Proteasome subunit alpha type 2 (P49722)	α 2	13	332	196	66
3	A23	Proteasome subunit alpha type 4 (Q9R1P0)	α 3	13	226	226	54
4	A10	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	α 4	6	186	145	29
5	A22	Proteasome subunit alpha type 5 (Q9Z2U1)	α 5	10	248	156	56
6	B3	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	α 6	16	296	156	58
7	E6	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	α 7	17	468	315	
8	B23	Proteasome subunit beta type 6 precursor (Q60692)	β 1	9	267	198	39
9	B10	Proteasome subunit beta type7 precursor (P70195)	β 2	6	186	158	20
10	B20	Proteasome subunit beta type 3 (Q9R1P1)	β 3	15	349	225	59
11	C5	Proteasome subunit beta type 2 (Q9R1P3)	β 4	14	362	224	66
12	C15	Proteasome subunit beta type 5 precursor (O55234)	β 5	14	345	196	67
13	C2	Proteasome subunit beta type 1precursor (O09061)	β 6	11	302	220	56
14	C14	Proteasome subunit beta type 4 precursor (P99026)	β 7	7	310	256	39
15	nicht identifiziert						
16	D7	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	α 7	13	387	276	49

17	D17	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	$\alpha 1$	10	185	115	44
18	D4	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	$\alpha 7$	17	215	106	48
19	D18	Proteasome subunit alpha type 2 (P49722)	$\alpha 2$	7	223	151	37
20	D24	Proteasome subunit beta type 2 (Q9R1P3)	$\beta 4$	7	261	196	42
21	E9	Proteasome subunit beta type 1 precursor (O09061)	$\beta 6$	10	233	148	53
22	E19	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	7	175	127	29

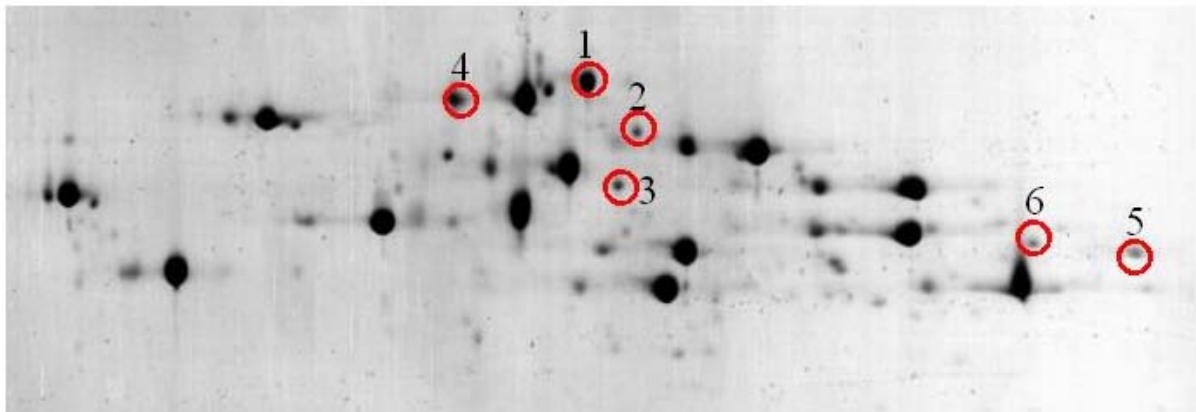


Abb. 33: Coomassie BB gefärbte 2D-PAGE von 20S Proteasomen (50µg) isoliert aus dem Großhirn von 12 Wochen alten Mäusen. Massenspektrometrisch analysiert wurden die rot umrandeten Spots

Informationen aus den MS-Analysen der Proteinspots der 2D-PAGE von 20S Proteasomen aus dem Großhirn von 12 Wochen alten Mäusen:

Sample Set Name: 080303_Platte25

Analysis Name: sp_50ppm_hirnherzmilz_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080303_Platte25

Sample Set Name: 080422_Platte25

Analysis Name: sp_50ppm_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080422_Platte25

Probe	Spot Label	Protein Name	UE	Peptide Count	Protein score	Total Ion Score	Sequence coverage
1	E1	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	$\alpha 1$	8	349	301	32
2	B11	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	5	171	142	25
3	B21	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	$\alpha 7$	11	265	156	44
4	nicht identifiziert						
5	B22	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	8	227	163	31
6	C1	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	5	143	107	25

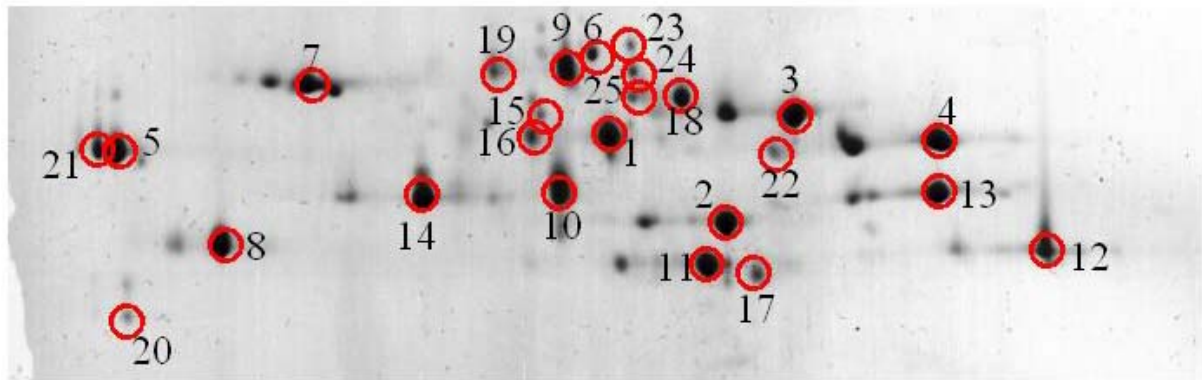


Abb. 34: Coomassie BB gefärbte 2D-PAGE von 20S Proteasomen (50µg) isoliert aus dem Mausherz von 12 Wochen alten Tieren. Massenspektrometrisch analysiert wurden zwei verschiedene Gele. Dargestellt ist nur eine 2D-PAGE, in dem die rot umrandeten Spots alle analysierten Untereinheiten aus beiden Gelen darstellen.

Informationen aus den MS-Analysen der Proteinspots der 2D-PAGE von 20S

Proteasomen aus Mausherzen:

Sample Set Name: 080207_Platte4 + 080204_Platte30

Analysis Name: SP_50ppm_mouse_herz_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080207_Platte4 + 080204_Platte30

[Sample Set Name: 080422_Platte25](#)

Analysis Name: sp_50ppm_dagmar_msms und sp_50ppm_dag_msms_2

Database: Swissprot

Spotset: 080422_Platte25

[Sample Set Name: 080303_Platte25](#)

Analysis Name: sp_50ppm_hirnherzmilz_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080303_Platte25

Probe	Spot Label	Protein Name	UE	Peptide Count	Protein Score	Total Ion Score	Sequence Coverage
1	E18	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	α 1	14	267	155	59
2	F3	Proteasome subunit alpha type 2 (P49722)	α 2	11	378	290	65
3	F13	Proteasome subunit alpha type 4 (Q9R1P0)	α 3	14	254	144	54
4	G14	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	α 4	13	264	154	52
5	G22	Proteasome subunit alpha type 5 (Q9Z2U1)	α 5	8	252	176	35
6	F20	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	α 6	10	224	106	34
7	G7	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	α 7	12	433	319	48
8	G13	Proteasome subunit beta type 6 precursor (Q60692)	β 1	7	226	158	36
9	H19	Proteasome subunit beta type7 precursor (P70195)	β 2	6	165	129	20
10	G24	Proteasome subunit beta	β 3	12	213	182	51

		type 3 (Q9R1P1)					
11	H5	Proteasome subunit beta type 2 (Q9R1P3)	$\beta 4$	13	278	155	62
12	H15	Proteasome subunit beta type 5 precursor (O55234)	$\beta 5$	14	270	124	67
13	H2	Proteasome subunit beta type 1 precursor (O09061)	$\beta 6$	13	185	180	59
14	H12	Proteasome subunit beta type 4 precursor (P99026)	$\beta 7$	8	188	200	42
15	nicht identifiziert						
16	H14	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	$\alpha 1$	7	168	119	27
17	B24	Proteasome subunit beta type 8 precursor (P28063)	$\beta 5i$	11	185	103	40
18	C7	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	12	245	161	45
19 *	B8	Proteasome subunit beta type 7 precursor (P70195)	$\beta 2$	4	75	54	13
20	nicht identifiziert						
21	C13	Proteasome subunit alpha type 5 (Q9Z2U1)	$\alpha 5$	7	252	188	37
22							
23 *	C2	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	3	64	51	12
24	G18	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	8	143	88	34
25	C14	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	5	165	130	24

* Nur Kandidat, nicht eindeutiges MSMS

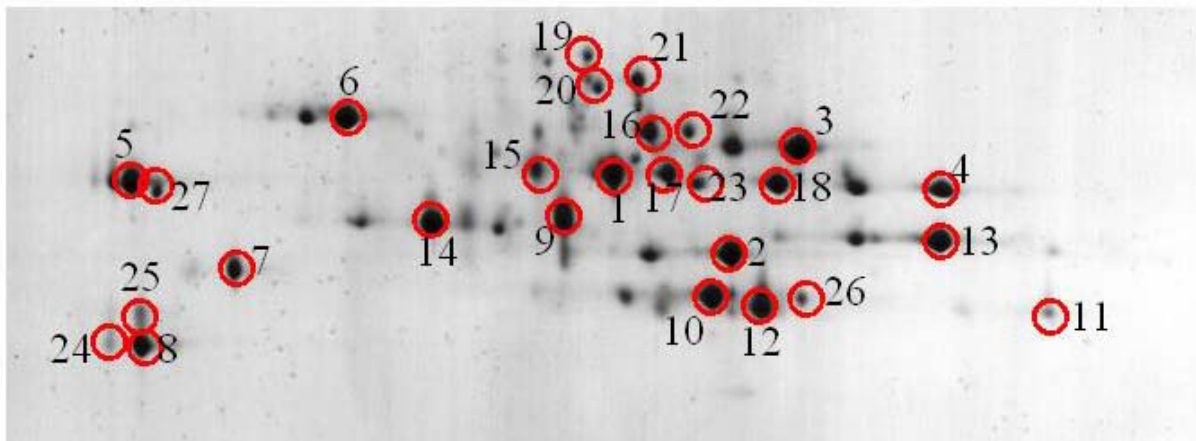


Abb. 35: Coomassie BB gefärbte 2D-PAGE von 20S Proteasom (50µg) isoliert aus der Mausmilz von 12 Wochen alten Tieren. Massenspektrometrisch analysiert wurden zwei verschiedene Gele. Dargestellt ist nur eine 2D-PAGE, in der die rot umrandeten Spots alle analysierten Untereinheiten aus beiden Gelen darstellen.

Informationen aus den MS-Analysen der Proteinspots der 2D-PAGE von 20S

Proteasomen aus Mausmilz:

Sample Set Name: 080204_Platte30

Analysis Name: SP_50ppm_mouse_milz_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080204_Platte30

Sample Set Name: 080303_Platte25

Analysis Name: sp_50ppm_hirnherzmilz_dagmar_msms

Database: Swissprot

Spotset: 080303_Platte25

Sample Set Name: 080422_Platte25

Analysis Name: sp_50ppm_dagmar_msms und ncbi_50ppm_dag_msms_2

Database: Swissprot

Spotset: 080422_Platte25

Probe	Spot Label	Protein Name	UE	Peptide Count	Protein Score	Total Ion Score	Sequence Coverage
1	C6	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	$\alpha 1$	10	240	173	45
2	C16	Proteasome subunit alpha type 2 (P49722)	$\alpha 2$	8	176	137	34
3	C22	Proteasome subunit alpha type 4 (Q9R1P0)	$\alpha 3$	10	171	108	42
4	A1	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	14	212	92	57
5	A13	Proteasome subunit alpha type 5 (Q9Z2U1)	$\alpha 5$	11	363	266	55
6	D6	Proteasome subunit alpha type 3 (O70435)	$\alpha 7$	14	440	322	53
7	D14	Proteasome subunit beta type 6 precursor (Q60692)	$\beta 1$	9	127	92	42
8	D24	Proteasome subunit beta type 9 precursor (P28076 / O35522)	$\beta 1i$	5	165	96	29
9	E9	Proteasome subunit beta type 3 (Q9R1P1)	$\beta 3$	5	80	60	31
10	E21	Proteasome subunit beta type 2 (Q9R1P3)	$\beta 4$	13	335	223	57
11	E6	Proteasome subunit beta type 5 precursor (O55234)	$\beta 5$	12	339	240	55
12	E18	Proteasome subunit beta type 8 precursor (P28063)	$\beta 5i$	14	323	225	53
13	F1	Proteasome subunit beta type 1 precursor (O09061)	$\beta 6$	13	313	212	56
14	F13	Proteasome subunit beta type 4 precursor (P99026)	$\beta 7$	5	89	57	32
15	F2	Proteasome subunit alpha type 6 (Q9QUM9)	$\alpha 1$	10	242	187	49
16	C10	Proteasome subunit beta type 7 precursor (P70195)	$\beta 2$	6	150	118	20
17	G1	Proteasome subunit beta type 10 precursor (O35955)	$\beta 2i$	6	132	88	28
18	G3	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	14	243	124	64
19	E2	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	7	212	157	28
20	E8	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	3	142	122	17
21	E14	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	9	257	18	31
22	F7	Proteasome subunit alpha type 1 (Q9R1P4)	$\alpha 6$	9	242	178	31

23	F19	Proteasome subunit alpha type 7 (Q9Z2U0)	$\alpha 4$	5	125	86	25
24	G22	Proteasome subunit beta type 9 precursor (P28076 / O35522)	$\beta 1i$	7	115	62	40
25	G24	Proteasome subunit beta type 9 precursor (P28076 / O35522)	$\beta 1i$	4	160	132	26
26	D9	Proteasome subunit beta type 2 (Q9R1P3)	$\beta 4$	5	131	92	34
27	D15	Proteasome subunit alpha type 5 (Q9Z2U1)	$\alpha 5$	6	228	185	28

Tabellarische Darstellung der Array-Ergebnisse:

Auswertungskriterien:

1. Die Gene müssen mindestens in einem der fünf Zustände präsent sein.
2. Um als Zu- oder Abnahme zu gelten, muss die Änderung mindestens den Faktor 2 erreichen, d.h. Zunahme um den Faktor 2, Abnahme um den Faktor 0,5
3. Die Absolutwerte müssen größer als 10. sein

Der Array in Zahlen: 45105 Proben

39.000 Transkripte

13.728 davon sind nicht exprimiert

31.377 sind präsent

Tab. 7: Array-Signalstärken der beta-Untereinheiten des 20S Proteasoms

UE	Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
beta1	Psmb6	4510	P	4501	P	4773	P	4375	P	4501	P	1448822_at
beta2	Psmb7	7078	P	6410	P	5923	P	6031	P	6724	P	1416240_at
beta3	Psmb3	2178	P	2165	P	2546	P	2122	P	2178	P	1417052_at
beta3	Psmb3	3411	P	3411	P	3688	P	3411	P	3411	P	1460198_a_at
beta4	Psmb2	5	A	12	P	10	P	5	M	7	P	1444377_at
beta4	Psmb2	9	A	8	M	8	A	9	A	8	A	1459641_at
beta4	Psmb2	1317	P	1317	P	1385	P	1279	P	1313	P	1448262_at
beta5	Psmb5	3979	P	4129	P	4573	P	4294	P	4129	P	1415676_a_at
beta6	Psmb1	30	M	27	P	27	P	28	P	28	A	1420052_x_at
beta6	Psmb1	152	P	150	P	148	P	175	P	150	P	1420053_at
beta6	Psmb1	3912	P	3880	P	4370	P	3880	P	3880	P	1448166_a_at
beta7	Psmb4	7213	P	7683	P	8686	P	8093	P	7587	P	1451205_at
beta7	Psmb4	7812	P	7163	P	6824	P	7722	P	8980	P	1438984_x_at
beta1i	Psmb9	19	A	20	P	23	P	23	P	139	P	1450696_at
beta2i	Psmb10	936	P	871	P	1008	P	969	P	997	P	1448632_at
beta5i	Psmb8	49	P	46	P	56	P	62	P	273	P	1422962_a_at
beta5i	Psmb8	13	A	11	A	11	A	12	A	12	A	1444619_x_at

Tab. 8: Array-Signalstärken der alpha-Untereinheiten des 20S Proteasoms

UE	Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
alpha1	PsmA6	136	P	122	P	122	P	122	P	119	P	1435317_x_at
alpha1	PsmA6	21	P	19	P	18	M	20	P	19	P	1435316_at
alpha1	PsmA6	5136	P	4950	P	4853	P	4794	P	5135	P	1416506_at
alpha1	PsmA6	6593	P	6593	P	6834	P	6373	P	6593	P	1437144_x_at
alpha2	PsmA2	4643	P	4440	P	4975	P	4581	P	4827	P	1448206_at
alpha3	PsmA4	3623	P	3684	P	3821	P	3580	P	3661	P	1460339_at
alpha4	PsmA7	2080	P	2103	P	2257	P	2103	P	2258	P	1423567_a_at
alpha4	PsmA7	1843	P	1833	P	2009	P	1797	P	1887	P	1423568_at
alpha5	PsmA5	1363	P	1438	P	1553	P	1228	P	1427	P	1424681_a_at
alpha5	PsmA5	2614	P	2614	P	2791	P	2374	P	2635	P	1434356_a_at
alpha6	PsmA1	153	P	122	P	125	P	125	P	125	P	1458292_at
alpha6	PsmA1	26	P	24	P	22	P	24	P	23	P	1436769_at
alpha6	PsmA1	30	P	28	P	25	P	28	P	28	P	1436770_x_at
alpha6	PsmA1	4194	P	4083	P	4352	P	3922	P	4763	P	1415695_at
alpha7	PsmA3	7565	P	7506	P	7795	P	7364	P	7710	P	1448442_a_at
alpha8	PsmA8	7	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1427170_at

Tab. 9: Array-Signalstärken der Untereinheiten des Regulators PA28

UE	Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
PA28 alpha	PsmE1	1399	P	1444	P	1484	P	1346	P	1633	P	1417056_at
PA28 beta	PsmE2	477	P	517	P	524	P	479	P	651	P	1417189_at
PA28 gamma	PsmE3	893	P	970	P	973	P	1038	P	847	P	1418079_at
PA28 gamma	PsmE3	631	P	567	P	557	P	676	P	631	P	1418078_at
PA28 gamma	PsmE3	8	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1438509_at

Tab. 10: Array-Signalstärken der Untereinheiten des Regulators 19S

UE	Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
Rpt1	PsmC2	6	P	6	A	6	P	7	P	6	A	1443307_at
Rpt1	PsmC2	6774	P	6774	P	6720	P	6705	P	7085	P	1435859_x_at
Rpt1	PsmC2	4068	P	4090	P	4111	P	4043	P	4090	P	1426611_at
Rpt2	PsmC1	3495	P	3389	P	3284	P	3460	P	3788	P	1416005_at
Rpt3	PsmC4	4544	P	3745	P	3145	P	4154	P	4643	P	1416290_a_at
Rpt3	PsmC4	2021	P	2196	P	2170	P	2264	P	2206	P	1416291_at
Rpt4	PsmC6	2568	P	2383	P	2516	P	2638	P	2523	P	1417771_a_at
Rpt5	PsmC3	4337	P	4208	P	4571	P	4524	P	4337	P	1416282_at
Rpt5i	PsmC3ip	55	P	52	P	53	P	53	P	53	P	1425271_at
Rpt5i	PsmC3ip	48	A	28	A	32	A	32	A	32	A	1442058_s_at
Rpt6	PsmC5	6016	P	6016	P	6078	P	6048	P	5805	P	1415740_at
Rpn1	PsmD2	3295	P	3108	P	3283	P	3171	P	3212	P	1415831_at
Rpn2	PsmD1	2362	P	3288	P	3110	P	2260	P	2782	P	1429291_at
Rpn3	PsmD3	1143	P	1174	P	1347	P	1266	P	1155	P	1448479_at

Rpn5	Psm12	3243	P	3093	P	3163	P	3405	P	3250	P	1448492_a_at
Rpn6	Psm11	136	P	127	P	125	P	128	P	125	P	1456059_at
Rpn6	Psm11	52	P	54	P	55	P	58	P	55	P	1456104_at
Rpn6	Psm11	735	P	736	P	648	P	684	P	696	P	1429370_a_at
Rpn6	Psm11	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1432726_at
Rpn7	Psm6	3150	P	2857	P	2603	P	2956	P	3389	P	1423696_a_at
Rpn7	Psm6	4115	P	4432	P	4449	P	4391	P	4391	P	1423697_at
Rpn8	Psm7	1237	P	1284	P	1439	P	1293	P	1293	P	1451056_at
Rpn8	Psm7	8	A	8	P	8	A	8	A	8	A	1454368_at
Rpn8	Psm7	79	A	78	A	78	A	80	M	79	M	1432820_at
Rpn9	Psm13	2011	P	2218	P	2383	P	2135	P	2266	P	1422459_a_at
Rpn9	Psm13	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1447843_at
Rpn10	Psm4	2347	P	2205	P	2713	P	2729	P	2317	P	1425859_a_at
Rpn10	Psm4	8	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1451725_a_at
Rpn11	Psm14	15	P	26	P	21	P	21	P	20	P	1459734_at
Rpn11	Psm14	213	P	156	P	146	P	198	P	175	P	1446521_at
Rpn11	Psm14	3880	P	3907	P	4299	P	3907	P	3872	P	1421751_a_at
Rpn11	Psm14	6	A	5	A	5	M	5	A	5	A	1457765_at
Rpn12	Psm8	2643	P	2777	P	3283	P	2772	P	2698	P	1423296_at
	Psm4	4358	P	4705	P	5213	P	5107	P	4440	P	1418874_a_at
	Psm5	729	P	733	P	821	P	771	P	771	P	1423234_at
	Psm9	5	P	4	P	4	P	5	A	4	M	1444321_at
	Psm9	26	A	25	A	25	A	26	A	25	A	1423387_at
	Psm9	26	P	22	P	22	M	25	P	23	P	1447670_at
	Psm9	298	P	305	P	372	P	302	P	350	P	1423386_at
	Psm10	514	P	477	P	468	P	478	P	477	P	1436559_a_at

Tab. 11: Array-Signalstärken der Untereinheiten der Regulators PI31

UE	Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
PI31	Psmf1	428	P	369	P	338	P	373	P	418	P	1424370_s_at
PI31	Psmf1	329	P	323	P	322	P	323	P	323	P	1451337_at
PI31	Psmf1	11	M	11	P	10	A	11	A	11	A	1424371_at
PI31	Psmf1	239	P	239	P	239	P	222	P	239	P	1424369_at

Tab. 12: Array-Signalstärken von interessanten Genen. Eine rote Darstellung bedeutet, dass die Expression als ‚nicht exprimiert‘ gewertet wird.

Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
Pomp	4242	P	4243	P	4232	P	4402	P	4013	P	1416979_at
Usp18	10	P	11	P	11	P	11	P	82	P	1418191_at
Ube2c	10	P	9	P	9	A	10	P	21	P	1452954_at
Gfap	259	P	313	P	346	P	346	P	954	P	1440142_s_at
Gfap	1372	P	1404	P	1772	P	1906	P	3796	P	1426508_at
Gfap	732	P	766	P	880	P	955	P	2248	P	1426509_s_at
Il1b	4	A	4	A	4	A	4	M	5	P	1449399_a_at
Il1a	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1421473_at
Il6	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450297_at
Tnf	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1419607_at
S100a9	20	P	553	P	257	P	1197	P	290	P	1448756_at

S100a8	21	P	512	P	229	P	1188	P	314	P	1419394_s_at
Stat1	109	P	132	P	124	P	145	P	241	P	1420915_at
Icam1	15	M	40	P	27	P	74	P	77	P	1424067_at
Tgfb1	30	P	30	P	29	P	30	P	62	P	1415871_at
Tgfb1	61	P	61	P	56	P	61	P	192	P	1448123_s_at
Tgfb1	43	P	50	P	53	P	53	P	113	P	1437463_x_at
Tap2	22	A	23	P	23	P	23	P	45	P	1453913_a_at
Isgf3g	75	P	68	P	67	P	90	P	185	P	1421322_a_at
Irf1	78	P	66	P	75	P	79	P	203	P	1448436_a_at
Tlr7	10	A	9	A	9	A	10	A	22	A	1422010_at
Cxcl10	24	A	17	A	21	A	41	A	137	P	1418930_at
Cxcl9	5	A	5	A	5	A	5	A	35	P	1418652_at
Ccl6	51	P	41	P	51	P	51	A	168	P	1417266_at
Ccl8	6	A	9	P	6	A	16	P	234	P	1419684_at
Ccl9	13	A	12	A	10	A	13	A	36	P	1448898_at
Ccl12	5	A	9	A	6	A	32	P	157	P	1419282_at
Ccl5	4	A	3	A	3	A	3	A	30	P	1418126_at
Cxcl12	58	P	119	P	96	P	115	P	66	P	1417574_at
Cxcl1	15	A	51	P	14	A	136	P	18	M	1419209_at
H2-D1/ H2-K1	149	P	144	P	147	P	160	P	300	P	1424948_x_at
H2-D1	30	A	30	A	44	A	39	A	119	P	1426324_at
H2-D1	83	P	140	P	148	P	151	P	381	P	1451683_x_at
H2-D1	825	P	1259	P	1337	P	1407	P	2691	P	1425545_x_at
H2-D1	30	A	30	A	44	A	39	A	119	P	1426324_at
H2-D1/ H2- L	840	P	1365	P	1367	P	1447	P	2928	P	1451784_x_at
H2-Aa	35	P	21	P	73	P	38	P	683	P	1435290_x_at
H2-Aa	11	P	10	A	10	P	11	A	122	P	1452431_s_at
H2-Aa	19	A	18	P	18	A	19	A	190	P	1438858_x_at
H2-Ab1	4	A	3	A	3	A	3	A	49	P	1451721_a_at
H2-Ab1	61	A	43	A	76	A	62	A	372	P	1450648_s_at
H2-K1	305	P	520	P	524	P	671	P	1323	P	1425336_x_at
H2-K1	80	P	130	P	129	P	137	A	321	P	1427746_x_at
H2-L	497	P	799	P	793	P	799	P	1653	P	1451931_x_at

Tab. 13: Array-Signalstärken der Interferone und ihrer Rezeptoren. Eine rote Darstellung bedeutet, dass die Expression als ‚nicht exprimiert‘ gewertet wird.

Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
Ifnar1	112	P	183	P	202	P	157	P	142	P	1449026_at
Ifnar2	310	P	384	P	378	P	416	P	399	P	1451462_a_at
Ifngr1	16	A	13	A	14	A	15	A	13	A	1443602_at
Ifnar2	109	P	114	P	120	P	126	P	134	P	1440169_x_at
Ifngr1	155	P	148	P	136	P	155	P	199	P	1448167_at
Ifngr2	471	P	504	P	585	P	504	P	497	P	1423557_at
Ifna1	6	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1450564_x_at
Ifna6	7	A	6	A	6	A	7	A	7	A	1450593_at
Ifna1, 2, 4-7, 9, 12, 14	4	M	4	A	4	A	4	P	4	A	1422403_at

Ifnab	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1450613_x_at
Ifng	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1425947_at
Ifnar2	54	A	54	M	46	M	55	P	54	P	1427691_a_at
Ifna5	6	A	5	A	5	A	6	A	6	A	1450614_x_at
Ifna11	5	A	4	A	4	A	5	A	4	A	1422332_at
Ifnb1	5	P	4	A	4	A	5	A	5	P	1422305_at
Ifna2	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1423028_at
Ifnar1	13	P	13	M	12	P	13	A	13	A	1442222_at
Ifna9	7	A	6	A	6	A	7	A	6	A	1422406_at
Ifna4	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422408_at
Ifna1, 2, 4-7, 9, 12, 14	5	M	4	P	4	A	5	A	5	A	1422404_x_at
Ifnz	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1427216_at
Ifngr2	11	M	11	M	10	A	11	M	11	A	1423558_at

Tab. 14: Array-Signalstärken der TNF's (tumor necrosis factor) und verwandte Proteine und deren Rezeptoren. Eine rote Darstellung bedeutet, dass die Expression als ‚nicht exprimiert‘ gewertet wird.

Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
C1qtnf4	11	A	31	P	26	P	11	A	9	A	1441648_at
Tnfsf10	5	P	6	P	6	P	13	P	8	P	1459913_at
Tnfrsf12a	56	A	78	A	97	A	80	A	82	M	1418572_x_at
Tnfsf12-tnfsf13	111	P	140	P	140	P	148	P	140	P	1418345_at
Tnfaip8l2	23	A	22	A	13	A	23	P	29	M	1452948_at
Tnfrsf13c	15	P	12	A	12	A	13	A	13	P	1419307_at
Edar	14	A	11	A	12	A	13	A	12	A	1447498_at
Tnfrsf19	23	P	18	P	15	P	24	P	24	P	1427600_at
C1qtnf9	7	P	6	A	6	A	6	A	6	A	1442033_at
Tnfrsf11b	16	P	14	P	12	P	15	A	14	P	1449033_at
Tnfaip3	74	P	73	P	60	P	90	P	93	P	1433699_at
Tnfrsf25	22	P	23	P	22	P	35	P	25	P	1422231_a_at
Tnfaip6	73	P	62	P	61	P	64	P	62	P	1418424_at
Tnfrsf1a	38	P	43	P	48	P	43	P	43	P	1417291_at
Arts1	6	A	6	M	5	A	6	A	9	P	1416942_at
Tnfaip1	537	P	650	P	689	P	560	P	586	P	1417865_at
Tnfrsf13b	9	P	8	M	8	M	9	P	14	P	1423182_at
Tnfaip2	12	A	10	A	10	A	11	A	13	M	1438855_x_at
C1qtnf3	12	A	11	A	11	A	12	P	11	A	1422606_at
Tnfaip8l1	176	P	157	P	209	P	184	P	176	P	1449125_at
Tnfrsf21	302	P	308	P	332	P	338	P	332	P	1422740_at
C1qtnf4	5433	P	5648	P	6068	P	6270	P	5356	P	1417050_at
Tnfrsf19	892	P	781	P	821	P	961	P	892	P	1448147_at
Tnfrsf19	34	P	34	P	39	P	34	P	30	P	1425212_a_at
Tnfsf13b	11	A	10	A	11	A	11	A	11	A	1458047_at
Tnfaip8	232	P	232	P	234	P	215	P	272	P	1416950_at
Arts1	19	A	17	P	18	M	19	P	19	P	1439068_at
Tnfsf11	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1419083_at
Tnfaip2	97	P	90	P	103	P	107	P	97	P	1457918_at
Tnfsf5ip1	5	P	5	P	5	P	5	P	5	P	1444264_at

C1qtnf7	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1429030_at
Tnfaip1	287	P	265	P	275	P	296	P	275	P	1417866_at
Tnfrsf21	1547	P	1606	P	1482	P	1687	P	1506	P	1450731_s_at
Tnfrsf9	8	A	7	A	8	A	8	A	8	A	1428034_a_at
Tnfsf13b	5	M	5	P	5	P	5	P	5	P	1445251_at
Tnfrsf22	5	P	4	P	4	A	5	P	4	P	1426095_a_at
Tnfrsf10b	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421296_at
Tnfaip8	7	P	7	P	7	A	7	A	7	A	1442753_at
Tnf	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1419607_at
Tnfsf8	9	A	8	M	8	A	9	A	9	A	1450272_at
C1qtnf7	8	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1460163_at
Tnfrsf9	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1460469_at
Tnfrsf8	4	A	4	A	4	A	4	M	4	P	1421649_at
Tnfrsf23	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422101_at
Tnfaip8	7	A	6	A	6	A	7	A	7	A	1457996_at
Tnfrsf1b	10	A	9	A	10	A	10	A	10	A	1448951_at
Tnfsf14	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450298_at
Tnfrsf1b	5	P	5	P	5	P	5	P	6	P	1418099_at
Tnfsf4	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1421744_at
Tnfsf10	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1420412_at
C1qtnf1	9	A	9	A	9	A	10	A	9	A	1448912_at
C1qtnf5/ Mfrp	237	P	242	P	252	P	244	P	243	P	1424762_at
Tnfsf11	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1451944_a_at
Tnfsf14	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421588_at
Edar	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1419724_at
Tnfsf12	9	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1445227_at
Tnfsf5ip1	969	P	939	P	957	P	914	P	968	P	1448212_at
Tnfrsf12a	39	A	38	A	42	A	39	A	39	A	1418571_at
Tnfrsf17	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1420782_at
Tnfrsf11b	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1418309_at
Tnfrsf19	11	A	11	A	11	A	11	A	11	A	1445949_at
Tnfsf9	4	A	4	A	4	A	4	M	4	M	1422924_at
Tnfrsf10b	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422344_s_at
Tnfrsf22	5	A	4	A	4	A	4	A	4	M	1422039_at
Tnfrsf11a	10	A	10	A	10	A	10	A	10	A	1430259_at
Tnfrsf18	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422303_a_at
Tnfaip8	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1444224_at
Tnfrsf11a	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1419214_at
Tnfsf10	9	A	9	A	9	A	9	A	9	A	1439680_at
Tnfaip2	5	A	5	A	5	A	5	M	5	A	1416273_at
Tnfsf13b	10	P	10	P	10	A	10	M	10	P	1460255_at
Tnfaip3	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450829_at
C1qtnf6	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1431856_a_at
Tnfrsf19	28	P	27	P	27	P	28	P	29	P	1415921_a_at
Tnfrsf14	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1452425_at
C1qtnf2	7	P	7	P	7	P	7	P	7	P	1431079_at
Tnfrsf19l	74	P	72	P	73	P	75	P	73	P	1455116_at
Tnfsf5ip1	2010	P	2002	P	2030	P	1958	P	2033	P	1425373_a_at
Tnfaip1	1290	P	1254	P	1281	P	1281	P	1281	P	1448863_a_at

Tnfrsf23	12	A	12	M	12	M	12	M	12	A	1442590_at
Tnfrsf22	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1422038_a at
Tnfaip8	19	A	19	M	19	A	19	A	19	A	1442239_at
Tnfrsf4	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1420351_at
Tnfsf12	57	P	57	P	57	P	57	P	56	P	1452440 at

Tab. 15: Array-Signalstärken der Toll-like Rezeptoren. Eine rote Darstellung bedeutet, dass die Expression als ‚nicht exprimiert‘ gewertet wird.

Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
Tlr7	10	A	9	A	9	A	10	A	22	A	1422010_at
Tlr1	10	P	8	M	10	P	10	P	10	P	1449049_at
Tlr2	12	P	14	P	14	P	14	P	14	P	1419132_at
Tlr3	107	P	93	P	92	P	99	P	114	P	1422781_at
Tlr4	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1430695_at
Tlr3	168	P	158	P	168	P	165	P	209	P	1422782_s at
Tlr4	7	A	6	A	6	A	7	A	7	A	1442827_at
Tlr6	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1421352_at
Tlr7	11	A	10	A	10	A	11	P	10	P	1449640_at
Tlr8	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450267_at
Tlr12	6	M	6	A	6	A	6	A	6	A	1437931_at
Tlr4	7	A	7	A	7	A	7	A	7	P	1418162_at
Tlr4	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1418163_at
Tlr9	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422083_at
Tlr7	10	A	10	A	10	A	10	A	10	A	1419848_x at
Tlr5	2	P	2	A	2	A	2	A	2	A	1450242_at
Tlr12	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1438329_at
Tlr13	11	A	11	P	11	P	11	P	11	P	1457753_at
Ticam1	5	M	4	A	4	A	4	M	4	A	1454676_s at

Tab. 16: Array-Signalstärken der Interleukine und deren Rezeptoren. Eine rote Darstellung bedeutet, dass die Expression als nicht exprimiert‘ gewertet wird.

Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
Il18bp	12	A	27	A	28	A	28	A	45	A	1450424_a at
Il1r1	56	A	80	A	78	A	97	A	80	A	1448950_at
Il1rapl2	14	A	24	P	28	P	16	A	16	M	1420462_at
Il13ra1	22	P	29	P	27	P	29	P	38	P	1427165_at
Il1rapl2	13	P	10	P	10	P	10	P	10	P	1446875_at
Il6ra	22	M	30	P	27	P	25	A	29	P	1452416_at
Nfil3	279	P	232	P	281	P	195	P	194	P	1418932_at
Il13ra1	52	P	44	P	43	P	57	P	82	P	1454783_at
Il17d	241	P	182	P	169	P	227	P	213	P	1435714_x at
Il1rap	76	P	57	P	51	P	77	P	74	P	1421844_at
Il33	597	P	530	P	455	P	550	P	491	P	1416200_at
Ilak1bp1	161	P	136	P	144	P	121	P	151	P	1422683_at
Ilak1	528	P	430	P	387	P	537	P	493	P	1438120_x at
Il2rg	12	A	12	P	12	M	19	P	13	P	1416295_a at

Il1rap	503	P	457	P	358	P	540	P	498	P	1439697_at
Ilf3	19	A	20	P	30	P	19	P	19	P	1422546_at
Ilf3	1047	P	1215	P	1231	P	1145	P	1145	P	1460669_at
Il10rb	185	P	187	P	192	P	227	P	234	P	1419455_at
Il13ra1	20	M	18	P	19	P	19	P	27	P	1427164_at
Il17ra	32	P	29	P	28	P	41	P	32	P	1420904_at
Il13ra1	5	P	5	P	5	P	5	P	8	P	1451775_s_at
Il2rg	7	A	8	P	6	A	7	P	7	M	1416296_at
Il1rap	111	P	141	P	108	P	122	P	118	P	1442614_at
Il7	10	A	9	A	9	A	10	A	9	A	1422080_at
Il6st	115	P	105	P	115	P	140	P	129	P	1460295_s_at
Il23a	7	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1419529_at
Il31	9	A	8	A	8	A	9	A	8	A	1430001_at
Il17d	22	P	21	P	21	P	29	P	22	P	1456612_at
Il11ra1,2	273	P	238	P	240	P	279	P	258	P	1417505_s_at
Il17rd	57	P	57	P	57	P	66	P	47	P	1429893_at
Il16	7	P	6	A	6	P	6	A	6	A	1443796_at
Il17ra	214	P	175	P	197	P	212	P	218	P	1420905_at
Irak1bp1	846	P	861	P	996	P	904	P	899	P	1431771_a_at
Il1rl2	5	A	4	A	4	A	5	A	4	P	1434903_s_at
Il10ra	8	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1456173_at
Irak1	237	P	250	P	250	P	271	P	250	P	1448668_a_at
Il13ra2	6	M	6	P	6	P	6	A	7	P	1422177_at
Il28ra	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1446908_at
Il1rapl2	9	P	9	P	10	P	9	P	9	P	1441168_at
Il1rapl2	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1446520_at
Il1b	4	A	4	A	4	A	4	M	5	P	1449399_a_at
Il9	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1450565_at
Il1rap	8	P	8	P	7	P	8	P	8	P	1421843_at
Il1rap	11	P	10	P	10	P	10	P	10	P	1449585_at
Il10ra	6	A	6	A	5	A	6	A	7	A	1448731_at
Il22 / Iltifb	11	A	10	M	10	P	10	A	10	P	1427624_s_at
Il11ra1,2	19	P	20	P	20	P	21	M	20	P	1459868_x_at
Il22ra2	6	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1437665_at
Il6st	102	P	97	P	95	P	106	P	97	P	1437303_at
Il5ra	9	A	9	A	9	A	9	A	9	A	1421620_at
Irak1	196	P	186	P	177	P	200	A	190	P	1438857_x_at
Ilf3	70	P	71	P	71	P	82	P	69	P	1436802_at
Il15	6	M	5	A	5	M	5	A	5	P	1418219_at
Il13	7	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1420802_at
Il12a	14	P	14	P	14	P	15	P	17	P	1425454_a_at
Il16	7	A	7	A	7	A	7	A	7	M	1448686_at
Il17re	4	A	4	A	4	A	4	P	4	A	1439357_at
Il1rapl2	7	P	7	P	7	P	7	M	7	A	1427645_a_at
Il1r2	9	A	8	A	8	A	8	A	8	M	1457108_at
Il1r1	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1459777_at
Il16	6	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1447814_x_at
Il13ra1	8	A	7	A	7	A	8	A	7	A	1425625_at
Il7r	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1448576_at
Il6st	708	P	718	P	647	P	759	P	708	P	1452843_at

Ilf2	950	P	916	P	918	P	891	P	916	P	1417949_at
Il1rap11	7	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1445821_at
Il17d	7	A	6	A	6	A	7	A	6	A	1445988_at
Irak2	180	P	186	P	178	P	197	P	185	P	1436507_at
Il21	7	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1450334_at
Il20ra	6	P	6	A	6	P	6	A	6	P	1446498_at
Irak4	8	A	7	A	7	A	8	A	7	A	1421670_a_at
Il27ra	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1449508_at
Il21r	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1450456_at
Sigirr	6	A	7	M	6	A	6	A	6	A	1449163_at
Il2rb	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1448759_at
Il6	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450297_at
Il10ra	8	A	7	A	7	A	8	A	7	A	1437808_x_at
Tirap	14	P	14	P	14	P	16	P	14	P	1457676_at
Ilf3	4	A	4	A	4	M	4	P	4	A	1443150_at
Il3	5	A	4	A	4	A	5	A	4	A	1450566_at
Ilf2	1261	P	1238	P	1145	P	1240	P	1251	P	1417948_s_at
Irak1	233	A	224	A	229	M	224	A	224	A	1460649_at
Il1rl2	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450273_at
Il12b	8	A	7	M	7	A	8	A	7	P	1419530_at
Il2ra	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1420691_at
Il1f5	6	A	5	A	5	A	6	A	5	A	1421370_a_at
Il18r1	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421628_at
Il18rap	4	A	3	A	3	A	4	A	4	A	1421291_at
Il1f5	4	M	4	A	4	A	4	P	4	A	1426507_at
Il2rb	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1417546_at
Il1rn	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1425663_at
Il1rl1	4	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1422317_a_at
Il7	7	M	7	A	7	A	7	A	7	P	1436861_at
Il17rc	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1457471_at
Il1rap11	4	A	3	A	3	A	4	A	3	A	1458964_at
Il10	4	P	4	P	4	A	4	P	4	P	1450330_at
Il12rb1	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1418166_at
Il2	6	A	5	A	5	A	6	A	6	A	1449990_at
Il6st	10	P	10	P	9	P	9	P	9	P	1421239_at
Il24	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1426181_a_at
Il2ra	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1420692_at
Il18rap	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1456545_at
Il3ra	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1419712_at
Il20rb	8	A	7	A	7	A	8	A	8	A	1437876_at
Il12b	5	A	5	A	5	M	5	A	5	A	1449497_at
Il9r	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421570_at
Irak3	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1430704_at
Il1rn	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1423017_a_at
Il15ra	8	P	7	P	7	P	7	P	7	P	1422397_a_at
Il18	1155	P	1155	P	1088	P	1115	P	1155	P	1417932_at
Il31ra	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1451535_at
Il17rd	3	P	3	P	3	M	3	A	3	A	1452471_at
Il4i1	9	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1419192_at
Il17a	5	A	5	A	5	P	5	A	5	P	1421672_at

Il1rn	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1451798_at
Il20	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421608_at
Il25	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1420740_at
Il7r	8	P	8	A	8	A	8	P	8	P	1448575_at
Il28ra	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1460598_at
Irak4	4	P	4	A	4	P	4	P	4	M	1451749_at
Il12rb2	4	A	4	A	4	A	4	P	4	A	1421623_at
Irak3	4	A	4	A	4	A	4	P	4	M	1435040_at
Il1f6	5	A	4	P	4	P	5	P	4	A	1418609_at
Il1rl1	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1425145_at
Il17rb	10	P	10	P	10	P	10	P	10	P	1420678_a at
Il5	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450550_at
Il6ra	8	A	9	A	8	A	8	A	8	A	1422270_a at
Il4	4	A	4	P	4	P	4	P	4	A	1449864_at
Il31ra	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1445095_at
Il1a	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1421473_at
Il17re	9	A	9	A	9	M	9	A	9	A	1426566_s at
Il1f8	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1425715_at
Il1f10	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1451957_at
Il11	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1449982_at
Il1f9	3	A	3	M	3	P	3	A	3	M	1425958_at
Il4ra	2	P	2	M	2	A	2	A	2	P	1447858_x at
Il15ra	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1448681_at
Il17b	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1431693_a at
Il17re	1	A	1	A	1	A	1	A	1	A	1452109_at
Il17rc	2	A	2	A	2	A	2	A	2	A	1419671_a at
Il4ra	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1423996_a at
Il1r2	12	A	12	A	12	A	12	A	13	P	1419532_at
Tirap	7	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1418685_at
Il16	15	A	15	A	15	A	15	A	15	A	1417391_a at
Il4ra	18	A	18	P	18	P	18	M	18	P	1421034_a at

Tab. 17: Array-Signalstärken der Chemokine und deren Rezeptoren. Eine rote Darstellung bedeutet, dass die Expression als nicht stattgefunden gewertet wird.

Gen Symbol	Kontrolle		OVA früh		OVA spät		MOG früh		MOG spät		Accession
Ccl12	5	A	9	A	6	A	32	P	157	P	1419282_at
Ccl8	6	A	9	P	6	A	16	P	234	P	1419684_at
Cxcl1	15	A	51	P	14	A	136	P	18	M	1419209_at
Cxcl10	24	A	17	A	21	A	41	A	137	P	1418930_at
Ccl5	4	A	3	A	3	A	3	A	30	P	1418126_at
Cxcl12	58	P	119	P	96	P	115	P	66	P	1417574_at
Cxcl9	5	A	5	A	5	A	5	A	35	P	1418652_at
Cklf	33	P	58	P	44	P	44	P	55	P	1425860_x at
Ccl28	11	P	14	P	28	P	14	P	11	P	1455577_at
Ccl6	51	P	41	P	51	P	51	A	168	P	1417266_at
Ccl9	13	A	12	A	10	A	13	A	36	P	1448898_at
Cx3cr1	216	P	312	P	311	P	163	P	231	P	1450020_at
Cxcl1	4	A	4	M	4	A	11	P	4	A	1457644_s at

Ccr1l	239	P	285	P	287	P	330	P	287	P	1437669_x_at
Cx3cl1	6	P	8	P	9	P	6	P	5	P	1421610_at
Darc	915	P	1258	P	1084	P	1157	P	943	P	1432273_a_at
Ccl9	40	P	41	P	41	P	40	P	79	P	1417936_at
Ccr1l	239	P	240	P	249	P	361	P	285	P	1437668_at
Ccl6	10	P	9	P	9	P	9	A	13	P	1420249_s_at
Cxcl14	1385	P	1535	P	1535	P	1710	P	1522	P	1418457_at
Cx3cl1	1540	P	1706	P	2040	P	1666	P	1468	P	1415804_at
Ccr5	139	P	137	P	137	P	157	P	196	P	1424727_at
Ccr1	12	A	11	A	11	A	12	A	11	A	1419610_at
Ccr5	13	P	13	P	12	P	13	P	19	P	1422259_a_at
Cxcl11	10	P	9	P	9	A	10	A	10	M	1419698_at
Ccl25	70	P	65	P	69	P	56	P	78	P	1418777_at
Ccr5	17	A	15	A	15	A	16	A	16	A	1422260_x_at
Cx3cr1	8	A	8	P	8	A	6	A	8	P	1450019_at
Cxcl13	5	P	5	A	5	A	5	M	6	P	1417851_at
Cxcl4	33	P	33	P	34	P	33	P	26	P	1448995_at
Ccr1	5	P	5	M	5	A	5	P	6	P	1419609_at
Cxcl5	9	A	8	A	8	A	9	P	9	P	1419728_at
Cxcr4	21	P	19	P	20	P	20	P	24	P	1448710_at
Cxcr6	10	A	9	A	9	A	10	A	10	A	1422812_at
Cxcl9	8	A	7	A	8	A	8	A	8	A	1456907_at
Cxcl11	8	A	7	A	7	A	7	A	7	A	1419697_at
Cx3cl1	6696	P	7021	P	6997	P	7450	P	6558	P	1415803_at
Cklf	31	P	32	P	30	P	26	P	30	P	1424495_a_at
Ccl28	7	P	6	P	7	P	7	A	7	P	1450218_at
Cmklr1	7	A	7	A	7	A	8	A	7	A	1456887_at
Ccl19	26	A	26	A	25	A	26	A	30	A	1449277_at
Ccbp2	30	P	29	P	30	P	31	P	34	P	1437937_at
Cxcl15	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1456428_at
Cxcl16	10	A	9	A	9	A	10	A	10	M	1449195_s_at
Ccl25	5	M	5	A	5	A	5	A	5	A	1458277_at
Ccl11	8	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1417789_at
Cxcr7	775	P	739	P	708	P	760	P	786	P	1417625_s_at
Ccr2	6	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1421187_at
Cklf	172	A	162	A	166	A	166	A	166	P	1436242_a_at
Cxcl12	657	P	580	P	650	P	650	P	650	P	1448823_at
Ccl27	2332	P	2250	P	2298	P	2404	P	2161	P	1419188_s_at
Ccr9	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1427419_x_at
Ccl22	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1417925_at
Ccl28	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450217_at
Cxcr6	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1425832_a_at
Cxcl1	2	P	2	P	2	P	2	P	2	P	1441855_x_at
Ccr1l	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1426139_a_at
Ccl1	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421688_a_at
Cxcl2	6	P	5	P	5	P	5	M	5	P	1449984_at
Ccl21a-c	7	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1419426_s_at
Ccl27	2711	P	2564	P	2657	P	2855	P	2711	P	1430375_a_at
Ccr9	10	A	9	A	9	A	9	A	9	A	1421920_a_at
Ccr2	5	A	5	M	5	A	5	P	5	M	1421188_at

Ccr3	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422957_at
Ccr2	5	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1460067_at
Xcr1	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1422294_at
Ccr9	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421919_a_at
Ccr12	6	A	6	A	6	A	6	A	6	A	1427736_a_at
Ccl21b	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1445238_at
Cklf	10	P	10	P	9	P	9	P	10	P	1451832_at
Ccr2	8	A	8	A	8	A	8	A	8	P	1421186_at
Ccl27	2585	P	2550	P	2548	P	2702	P	2501	P	1434962_x_at
Ccr8	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422291_at
Cxcr3	5	P	5	P	5	P	5	P	5	P	1449925_at
Ccl20	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422029_at
Cxcl13	5	P	5	A	5	A	5	A	5	M	1448859_at
Cx3cl1	8	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1441884_x_at
Cebp2	4	A	3	A	3	M	3	P	3	P	1422111_at
Cxcl12	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1439084_at
Ccl3	5	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1419561_at
Ccl2	8	A	7	A	8	A	8	A	8	P	1420380_at
Cmklr1	5	A	5	A	5	A	5	A	5	A	1426072_at
Ccr11l	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1422349_at
Ccr4	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1421655_a_at
Ccl17	17	P	16	M	17	P	17	P	17	M	1419413_at
Ccl7	9	A	9	A	9	A	9	A	9	M	1421228_at
Cxcl15	5	A	5	P	5	A	5	A	5	A	1421404_at
Ccr6	3	A	3	A	3	A	3	A	3	A	1450357_a_at
Ccl4	3	A	3	A	3	A	3	A	3	P	1421578_at
Ccr10	2	A	2	A	2	A	2	A	2	A	1421420_at
Xcl1	8	A	8	A	8	A	8	A	8	A	1419412_at
Cebp2	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1422112_at
Cklf	22	P	21	P	21	P	21	A	21	P	1451374_x_at
Ccr7	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1423466_at
Cxcl14	772	P	780	P	780	P	773	P	783	P	1418456_a_at
Ccl24	4	A	4	A	4	A	4	A	4	A	1450488_at
Cklf	7	A	7	A	6	A	7	A	7	A	1455615_at
Cklf	12	P	12	P	12	P	12	P	12	P	1425769_x_at
Cxcl16	5	A	5	P	5	P	5	M	5	P	1418718_at

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Burkhardt Dahlmann und Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit bedanken.

Meinem Betreuer Prof. Dahlmann möchte ich insbesondere für die hervorragende Betreuung, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit selbständigen und eigenverantwortlich zu arbeiten danken.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Orhan Aktas, Friederike Schröter, Tim Prozorovski und Stephanie Balz für die Durchführungen der EAE-Experimente und die Hilfestellung bei der Immunhistochemie.

Mein Dank geht auch an die Mitglieder der Massenspektrometrie: an Dr. Katharina Janek und Agathe Niwinda für die Proteinidentifizierungen mittels MALDI-TOF und an Kathrin Textoris-Taube und Christine Keller für die Analysen meiner *in vitro* Verdau-Experimente.

Dr. Ursula Zimny-Arndt (MPI für Infektionsbiologie) danke ich für die hervorragenden 2D-Gele.

Herzlich Dank auch an das ABC (Alex, Burkhardt, Caro) Team mit den Neuzugängen Sabrina und Isa und das Adoptiv-Mitglied Thorsten für die bisher schönste Zeit meines wissenschaftlichen Forschens.

Mein großer Dank gilt natürlich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kloetzel, die durch ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit auch mit beigetragen haben.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, Februar 2009